



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Agronomia Ambientale Internazionale  
Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (SAF)  
Agr. 02

BIOREMEDIATION: *Trichoderma harzianum* INTERAZIONI E  
POSSIBILE RIMEDIO ALL'ACCUMULO DI RAME IN  
AGRICOLTURA BIOLOGICA

IL DOTTORE  
**Di Bella Vittorio**

IL COORDINATORE  
**Prof. Dazzi Carmelo**

IL TUTOR  
**Prof Ignazio Poma**

CICLO \_\_XXVI\_\_  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO \_\_03/2016\_\_

# INDICE

<b>Prefazione</b>	Pag. 4
<b>Abstract</b>	Pag. 5
<b>Introduzione</b>	Pag. 7
<b>Bioremediation</b>	Pag. 10
<b>Agronomia</b>	Pag. 14
<b>Capitolo 1</b>	Pag. 16
1.1 Il Suolo	Pag. 17
1.2 Caratteristiche fisiche dei suoli	Pag. 23
1.3 Caratteristiche chimiche dei suoli	Pag. 26
1.4 Caratteristiche biologiche dei suoli	Pag. 31
1.5 Caratteristiche dei suoli siciliani	Pag. 33
<b>Capitolo 2</b>	Pag. 35
2.1 Metalli pesanti	Pag. 36
2.2 Ciclo dei metalli pesanti	Pag. 39
2.3 Rame	Pag. 42
2.4 Storia del rame e dei suoi usi	Pag. 45
2.5 Il rame in agricoltura	Pag. 49
2.6 Attività biochimica del rame	Pag. 51
2.7 Inquinamento da rame	Pag. 54

<b>Capitolo 3</b>	Pag. 57
3.1 Funghi del suolo	Pag. 58
3.2 Capacità di assorbimento di metalli pesanti ad opera dei funghi	Pag. 64
3.3 Simbiosi funghi piante: una preziosa risorsa	Pag. 68
3.4 Funghi simbiotici opportunisti	Pag. 71
 <b>Capitolo 4</b>	 Pag. 75
4.1 <i>Trichoderma</i>	Pag. 76
4.2 <i>Trichoderma harzianum</i>	Pag. 79
4.3 Interazione <i>Trichoderma</i> e piante, simbionte e opportunisti	Pag. 81
4.4 <i>Trichoderma</i> e i metalli pesanti	Pag. 84
4.5 <i>Trichoderma</i> e il rame: interazioni e attività	Pag. 86
4.6 Interazioni rame e <i>Trichoderma harzianum</i>	Pag. 89
 <b>Capitolo 5</b>	 Pag. 92
5.1 Obiettivo della ricerca	Pag. 93
5.2 Materiali e metodi	Pag. 94
5.3 Collocazione geografica dei campionamenti	Pag. 97
5.4 Determinazione del contenuto di rame nei suoli	Pag. 101
5.5 Produzione del ceppo <i>Trichoderma harzianum</i>	Pag. 107
5.6 Crescita su substrato inquinato	Pag. 105
5.7 Recupero e misurazione del rame assorbito	Pag. 115
 <b>Discussione e Conclusioni</b>	 Pag. 120
 <b>Bibliografia</b>	 Pag. 126

## **Ringraziamenti**

Nessuno realizza un lavoro di ricerca da solo. E questo è ancora più vero quando ci si dedica per la prima volta ad un settore complesso come quello affrontato.

I miei ringraziamenti e la dedica vanno:

Alla mia famiglia, in primis, che è per me sempre fonte di ispirazione.

Al Prof. Ignazio Poma, mio tutor, per la tranquillità che ha sempre saputo trasmettere al sottoscritto.

Al Prof. Livio Torta, che con i suoi consigli, il suo aiuto e le sue capacità ha saputo aiutarmi in un compito non facile, quello di farmi comprendere un mondo complesso come quello dei funghi.

Al Prof. Josep Armengol Forti e alla sua equipe dell'Università di Valencia che per sei mesi sono stati uno splendido gruppo di lavoro e quasi una famiglia.

Al Prof. Filippo Saiano che mi ha supportato nella parte relativa alla chimica di laboratorio e nelle analisi che hanno permesso di raggiungere il risultato ottenuto.

Infine a tutti gli amici dei laboratori di microbiologia e fitopatologia, ai colleghi dottorandi come me e a tutti quelli che mi vogliono bene e a chi mi vuole male, perché costituiscono un ulteriore stimolo a raggiungere i risultati desiderati.

## Prefazione

Le motivazioni che mi hanno portato a realizzare questo lavoro partono da lontano. Sempre più infatti mi è sembrato di notare negli studi di geologia la mancanza di attenzione verso quella che è la parte più superficiale della crosta terrestre. Tuttavia questa sensazione sarebbe rimasta tale senza la mia partecipazione ai Master di II livello della Facoltà di Scienze Agrarie.

Durante l'ultimo sostenuto con pieno successo nel 2012, il mio interesse si è focalizzato sui funghi del suolo e sulla loro capacità di assorbire e interagire con i metalli e con moltissime sostanze tossiche.

Così quando si è trattato di scegliere la mia tesi finale e il suo argomento non ho avuto dubbi.

Ne è venuto fuori un discreto lavoro, molto generale, ma anche molto efficace, che pubblicato in rete, ha avuto un discreto successo.

Nel mentre il mio interesse non era scemato e mi ha portato ad esplorare sempre più il mondo della Bioremediation e di quella che è una branca di essa. La Fungal Remediation. Il lavoro si inserisce in questo settore, molto particolare in cui tanto è stato scoperto e ancora tantissimo c'è da scoprire.

L'attività del fungo *Trichoderma harzianum* è importante in tantissimi settori, da quello delle bonifiche, fino all'agricoltura e all'industria con l'utilizzo degli enzimi.

Le interazioni del fungo con il rame sono però ancora poco conosciute, anche perché il rame è un elemento tossico solo con concentrazioni elevate, normalmente poco presenti in natura. Lo studio effettuato muove i primi passi in questo campo e lo fa in un settore che per la Sicilia è molto importante e in un ambito che in questi anni sta crescendo, l'agricoltura e le sue produzioni di qualità, con in particolare il crescente settore dell'agricoltura biologica.

## Abstract

Heavy metals and pollutants are a serious problem in more countries. The soils are particularly vulnerable, because people don't know the problem, but also because the soils often change within a few meters, and so, the solutions are complex or leading to transform soils in hazardous waste and transport them in landfills.

The bioremediation is a great opportunity to restore a natural balance in soils, using plants and microorganism to adsorb, remove or transform soils pollutants.

Soil fungi are a very important resource to use. They can absorb heavy metals, and this mechanism, sometimes is really specific for every fungus. Some of them absorb lead, but not magnesium or copper. Others absorb chromium, nickel or cadmium, but not other metals. Some of them grew up if there is a type of metal in soils but if there are others, they can't.

Some of them produce enzymes or other substances that can degrade lignin and other polymers like polystyrene. Some species live in symbiosis with plants, others are only symbiotic opportunists.

One of the most famous is the genus *Trichoderma*. All the species of this genus are saprophytic, but they also live in symbiosis with plants, stimulating the growth and protect them from pathogens and pollutants.

The aim of this work is to demonstrate the ability of *Trichoderma harzianum* to grow in presence of high concentrations of copper sulfate, a well known fungicide, used in organic farming.

We put a fragment of a colony of *Trichoderma harzianum* on Petri dishes with PDA amended with copper sulfate at different concentrations, from 50 mg, to 800 mg. and we estimate the growth of colonies. After, we recovered the mycelium and using a spectrophotometer analyzer we find the amount of copper absorbed by the fungus.

The results put in evidence two aspects: *Trichoderma harzianum* absorbs copper, and can also play its role of plants protector in soils rich of copper sulfate.

## **Introduzione**

Nel corso dell'ultimo secolo e nel primo decennio di questo, si è avuto una forte crescita della popolazione mondiale e un rapido sviluppo delle economie di alcuni paesi in precedenza incapaci di crescere e creare sviluppo, oggi invece sempre più tra le economie trainanti del pianeta. A questa crescita, però fanno seguito alcuni problemi di non facile risoluzione, tra i quali la forte industrializzazione, con un utilizzo spesso scriteriato dei suoli e una loro gestione molto disinvolta, spesso priva di vincoli o di uno sviluppo sostenibile. Si perdono così terreni adattissimi all'agricoltura per creare nuovi insediamenti urbani ed industriali relegando l'agricoltura in aree poco propizie, oppure si inquina il suolo irreparabilmente.

Il problema è fortemente sentito anche in Italia, dove il territorio, particolarmente fragile e con equilibri spesso delicati, ha visto negli anni settanta e ottanta del secolo scorso una gestione spesso scriteriata e analoga a quella dei paesi precedentemente citati, i cui risultati si vedono oggi, non solo in termini di fenomeni di dissesto idrogeologico, ma anche di inquinamento di aree che non possono più essere sfruttate a fini agricoli e quando e se devono essere recuperate, spesso le modalità di recupero si attuano con sistemi costosi e che in molti casi comportano l'asportazione o la distruzione del suolo, spesso a sua volta trasformato in rifiuto con definitiva perdita di esso e problemi relativi al suo stoccaggio.

L'inquinamento da metalli pesanti, spesso legato alle attività industriali, ma anche a pratiche agricole con utilizzo intensivo ed estensivo di prodotti chimici, presenta spesso problemi di grande difficoltà, in quanto essendo essi elementi chimici, non molecole, non subiscono processi di degradazione e possono rimanere all'interno del suolo per tempi indefiniti, peggiorandone la qualità e, tramite le soluzioni percolanti possono poi spostarsi, raggiungere le falde acquifere e in ultimo il mare, dove danno



vita a fenomeni di bioaccumulo negli organismi a partire dai microrganismi per poi risalire fino ai vertici della catena alimentare, uomo compreso.

I tentativi fatti per la bonifica di questi elementi sovente sono costosi, e al limite possono portare alla totale distruzione del suolo stesso. I metalli pesanti formano infatti legami molto stabili e resistenti con le particelle del suolo, in particolare argille e sostanza organica, determinando un peggioramento della qualità del suolo provocato dalla riduzione della capacità di scambio cationica e dalle modifiche che la loro presenza determina all'interno dei reticoli cristallini.

Essi vengono anche assorbiti dalle radici delle piante, compromettendone lo sviluppo, impedendo o ostacolando la fruttificazione, determinando una cattiva qualità dei frutti, oppure legandosi agli enzimi e invalidandoli con conseguenze tossiche per la pianta che possono arrivare fino alla morte, a seconda del livello di tossicità e di concentrazione di essi. Attraverso i vegetali entrano poi nella catena alimentare determinando fenomeni di bioaccumulo che aumentano man mano che si sale, fino a raggiungere i valori massimi nei predatori superiori e quindi nell'uomo.

Gli effetti di solito sono in funzione del loro grado di tossicità. Alcuni di questi elementi a basse concentrazioni sono indispensabili per gli organismi, mentre diventano tossici a concentrazioni più elevate. Altri invece sono tossici con qualunque livello di concentrazione.

Particolari poi sono quegli elementi che diventano tossici a concentrazioni molto elevate. Alcuni di questi, a concentrazioni modeste, sono elementi essenziali per l'organismo, che privatone, può presentare scompensi metabolici anche molto gravi, ma in concentrazioni elevate possono bloccare reazioni chimiche essenziali per l'organismo o innescarne altre, non accettabili.

Il rame appunto appartiene a questi elementi. La sua indispensabilità per gli organismi è nota e descritta efficacemente, e la sua tossicità si riscontra

solo con valori di concentrazione molto elevate. Si trova presente nell'ambiente per cause naturali, in quantità non pericolose, tuttavia, a seguito dell'intervento dell'uomo che lo usa da millenni per i suoi scopi, la sua concentrazione nell'ambiente è aumentata sensibilmente e si incominciano a individuare sempre più spesso casi di avvelenamento da rame nelle coltivazioni e nella flora di siti inquinati.

## **Bioremediation**

Dall'inizio degli anni ottanta, anche a seguito di alcuni incidenti ambientali particolarmente gravi, le problematiche relative alla salvaguardia e al recupero degli ambienti inquinati hanno sempre più preso campo. Con il disastro nucleare di Chernobyl nel 1986, si prese consapevolezza della capacità dell'uomo di inquinare non solo a livello puntuale, ma su vaste aree che potevano arrivare a comprendere anche più stati, mentre studi sull'atmosfera e sulle piogge acide dimostravano che le polveri sottili derivanti dalle combustioni potevano essere trasportate per centinaia di chilometri prima di depositarsi.

I tentativi di bonifica all'inizio vennero effettuati con metodi chimici e fisici, finalizzati o a rimuovere la sostanza inquinante o a trasformarla in una sostanza innocua o più facilmente recuperabile della sostanza di origine. Questi metodi hanno avuto un discreto successo soprattutto con i liquidi e con i fluidi in generale. Con il suolo sono sempre stati poco efficaci, anche perché per applicarli occorreva rimuovere il suolo dal sito, e questo inevitabilmente ne altera le caratteristiche. Inoltre spesso la sostanza organica e le particelle argillose interagiscono con le sostanze inquinanti creando legami stabili con esse e nuove molecole più stabili e difficili da degradare. Tutto questo spesso determina l'impossibilità di recuperare il suolo e la sua conseguente trasformazione in rifiuto speciale con ovvi problemi di stoccaggio di esso in siti appositamente selezionati.

Lo stesso frequentemente avviene anche a seguito dei trattamenti di bonifica.

Nel tentativo di trovare una soluzione a un problema che si presenta sempre più complicato con il passare degli anni, l'attenzione degli studiosi inizia però ad appuntarsi sulla capacità di alcune piante a vivere su suoli inquinati, anche in modo molto grave, senza risentirne apparentemente. Con il

prosieguo degli studi e delle sperimentazioni, ci si accorge sempre più che non solo le piante, ma anche altri organismi sono in grado di vivere in ambienti inquinati e degradati, e che sono anche in grado di estrarre o degradare o immobilizzare le sostanze inquinanti, con benefici e miglioramento della qualità ambientale.

A seguito di queste scoperte si va sempre più affermando il concetto di bioremediation, intesa come strategia che si basa sulle capacità di piante e microrganismi di vivere in ambienti degradati, migliorando la qualità di essi, permettendone il recupero e infine il ritorno di quelle specie che, molto meno tolleranti, non sono in grado di vivere in quegli ambienti.

Il campo di azione della bioremediation è quindi molto vasto, e va gestito da personale specializzato e avente le competenze necessarie, in quanto occorre tenere conto del tipo di inquinanti che si intende rimuovere, e dell'attività dell'organismo utilizzato e se del caso, delle modalità di recupero di questo, prima che entrando in competizione con altri organismi, determini un'alterazione dell'equilibrio che si intendeva ripristinare.

I primi tentativi vennero effettuati nel campo dell'inquinamento da idrocarburi, usando batteri in grado di degradare il petrolio, trasformandone le molecole in altre, meno complesse e più facilmente degradabili o non tossiche per gli organismi. In occasione del disastro della Exxon Valdez, questa tecnica si rivelò molto efficace, permettendo il recupero di ampie zone del litorale che parevano irrimediabilmente perdute.

Altri batteri si sono rivelati molto efficaci nell'assorbimento di inquinanti da scarichi industriali, nel trattamento delle acque reflue, nel trattenere e rielaborare particelle tossiche.

In altri casi sono le piante a rivelarsi utilissime, in quanto in grado di assorbire grandi quantità di sostanze tossiche. Vengono infatti dette iperaccumulatrici, proprio per questa caratteristica. L'accumulo delle sostanze può avvenire in diversi organi delle piante, quali le radici, il fusto

le foglie o i frutti, permettendo così un facile recupero della sostanza inquinante, che viene estratta dal suolo, mentre la pianta può venire smaltita più facilmente come rifiuto o utilizzata per la produzione di biomassa.

Vi sono poi casi in cui la pianta emette nell'atmosfera la sostanza inquinante attraverso la respirazione. Ad esempio la pianta del tabacco, che, in grado di assorbire il mercurio sotto forma di ione, lo riduce a mercurio metallico e lo rilascia nell'atmosfera.

All'interno del più vasto campo della bioremediation, suscita sempre più interesse la fungal bioremediation, definita da Eaton nel 1985 "Applicazione che si avvale dei funghi per ristabilire l'equilibrio in habitat naturali contaminati da un ampio spettro di inquinanti." Questa tecnica sfrutta la capacità dei funghi di assorbire sostanze chimiche tossiche per molti altri organismi, senza risentirne, o la loro capacità di degradarle tramite enzimi in sostanze più semplici che a loro volta possono essere degradate da altri organismi o non essere tossiche. I funghi infatti sono capaci di degradare cellulosa e lignina, in quanto dotati di enzimi in grado di spezzare il legame ciclico degli idrocarburi aromatici. Il fungo inoltre è in grado grazie alle dimensioni delle sue ife, pari o inferiori ai 5  $\mu\text{m}$  di esplorare parti del suolo che non possono essere raggiunte dalle piante, andando così ad estrarre i metalli e gli inquinanti direttamente all'interno dei reticoli cristallini.

Molti problemi e perplessità permangono a causa dell'impossibilità di potere recuperare le ife dal suolo (ad oggi non si è riusciti a trovare un metodo che lo permetta senza alterare le caratteristiche del suolo stesso) e con esse la sostanza inquinante, specie nel caso dei metalli. Tuttavia la presenza del reticolo fungino all'interno dei suoli, la presenza di più colonie dello stesso ceppo fungino, permettono l'assorbimento e l'immobilizzazione dell'inquinante, spesso oltre che con l'assorbimento,

anche con l'uso da parte del fungo di sostanze chelanti che bloccano l'elemento impedendone la dispersione e garantendo l'impossibilità di esso di colpire con la sua tossicità altri organismi.

## **Agronomia**

Per Agronomia si intende l'insieme di tutte quelle pratiche colturali che consentono il migliore sviluppo e il massimo rendimento possibile dei terreni agricoli. Tiene quindi conto sia del tipo di colture, della qualità dei suoli, del clima, ma anche di tutto quelle pratiche che permettono di ottenere risultati positivi attraverso ottimizzazione e la riduzione al minimo indispensabile degli interventi umani, sia in termini di attività, sia in termini di apporti chimici alle colture.

Negli ultimi tempi l'agronomia oltre ad occuparsi della coltivazione di piante orticole ed ornamentali e di tutti gli aspetti legati direttamente o indirettamente alla produzione, ha cominciato a dovere anche tenere conto degli aspetti legati alla tutela dell'ambiente e alla corretta gestione dei territori, al fine di ottenere sempre dei risultati positivi e una resa ottimale dai terreni agricoli, ma anche il mantenimento delle capacità produttive del suolo e delle sue potenzialità nel tempo, permettendo un suo corretto utilizzo e la sua gestione anche alle generazioni future.

In questo ambito per l'agronomo sta sempre più assumendo importanza il suolo non più inteso solo nelle sue componenti inorganiche, (scheletro, sabbia, limo, argilla, sostanza organica e minerali), ma anche inteso come comunità di microrganismi e loro rapporti, in grado di sostenere e garantire quell'equilibrio che permette la crescita delle piante, il suo miglioramento qualitativo e produttivo, fino poi a spingersi alla possibilità di recuperare all'agricoltura terreni improduttivi o esclusi dal ciclo produttivo, in quanto inquinati da sostanze ed elementi chimici troppo pericolosi per poterne permettere l'ingresso nella catena alimentare, o perché la stessa pianta non riesce a svilupparsi per l'eccessiva tossicità.

La possibilità di potere tornare a coltivare in queste aree, oltre ad essere importante dal punto di vista strettamente agrario, è altrettanto importante

da un altro punto di vista: negli ultimi anni si è infatti assistito a un graduale ma netto cambiamento del clima, con una forte radicalizzazione degli eventi. Sempre più di frequente si passa da temperature miti e quasi estive, a temperature invernali, con una forte estremizzazione anche degli eventi piovosi.

Le precipitazioni infatti, sempre più spesso più che in durata, sono aumentate in termini di intensità, generando eventi piovosi che si potrebbero definire dei “quasi monsoni” e che i giornalisti hanno finito col definire “bombe d’acqua”.

Molti dei siti inquinati sono spesso abbandonati a se stessi e si trovano in aree a forte rischio idraulico (zone inondabili), o a rischio di instabilità, e questo li rende pericolosi, in quanto parte degli inquinanti possono raggiungere e contaminare altre aree per effetto delle acque di dilavamento o di fenomeni di dissesto geologico anche estesi.

La possibilità di recuperare questi siti con metodi naturali, rendendoli anche una potenziale fonte di profitto, che gradualmente va anche migliorandosi, perché alcune tecniche di bioremediation permettono attraverso lo sfruttamento di biomasse di estrarre l’inquinante riducendone così gradualmente la concentrazione, fino a portarla a livelli al di sotto di quelli critici e quindi recuperando il terreno alla propria funzionalità e alla possibilità di sostenere anche colture più pregiate ma più suscettibili, permettono anche di impedire che queste aree rimanendo abbandonate diventino aree di diffusione dell’inquinante.



# **CAPITOLO 1**

## **IL SUOLO**

## 1.1 Il suolo

Il suolo è la parte più superficiale della crosta terrestre, parzialmente derivata dall'alterazione delle rocce ad opera dell'azione dei microrganismi e degli agenti ambientali, che gradatamente ne aggrediscono i minerali, liberando gli elementi in esso presenti e formando altri minerali detti secondari, spesso più stabili rispetto ai minerali di partenza, in quanto formati in condizioni ambientali subaeree, mentre quelli di partenza si erano formati in profondità, all'interno della crosta, in condizioni ambientali totalmente diverse.

Già nel 1889 Docučaev aveva intuito molti dei meccanismi genetici di un suolo, ma solo nel 1941 Jenny aveva formalizzato la maggior parte dei meccanismi di formazione del suolo, collegandoli tra loro tramite l'equazione:  $S = f(cl, o, r, p, t, \dots)$

All'interno dell'equazione sono presenti tutti i termini precedentemente citati. Tuttavia, Jenny stesso qualche anno dopo modificò la sua equazione, rendendola in una forma ritenuta da lui più accettabile.

$$l, s, v, a = f(L_0, P_x, t)$$

Nella nuova versione, vengono considerati anche l'ecosistema, potenziali di flusso, vegetazione, il valore della proprietà al momento della formazione del suolo, che in precedenza o non erano stati considerati, o erano sottostimati.

Ad oggi sono state proposte altre equazioni, tuttavia le due proposte da Jenny, hanno sempre costituito il punto di partenza.

Nel 1993 invece ad opera della Soil Survey Division Staff, vengono delineati i principali orizzonti in cui si suddivide un suolo, gettando così le basi per le moderne classificazioni dei suoli.

Il suolo è un sistema trifasico, vi si trovano gas, liquidi e solidi. Per più del 90% è formato di composti minerali e per una percentuale variabile tra lo 0,1 e il 10% di sostanza organica. A sua volta la sostanza organica è formata da organismi viventi solo per il 15% , il resto sono sostanze umiche e materia semidecomposta.

Se poi andiamo ad investigare la parte vivente della sostanza organica, ci accorgiamo che essa è formata prevalentemente da microrganismi (funghi, batteri e alghe) per un totale che quasi sfiora l'80%. Solo il resto è formato dalle radici delle piante e dalla mesofauna.

Il suolo è una risorsa non rinnovabile, almeno non in tempi brevi. Inoltre se e quando si rinnova, non avrà più le stesse caratteristiche del suolo che lo ha preceduto, in quanto molti dei processi che lo formano si saranno modificati.

Interviene e svolge un ruolo essenziale in vari processi indispensabili per la vita degli organismi. Tra i più importanti vi sono il controllo e la gestione del deflusso delle acque in superficie. Ne consente l'infiltrazione e durante questo processo agisce come un filtro, depurando l'acqua che poi subirà ulteriori processi di depurazione attraverso il substrato roccioso.

Fornisce alloggio e sostentamento alla fauna microbica, molta della quale può vivere solo grazie alle particolari condizioni ambientali dovute alla sua presenza. Grazie alle sostanze chimiche presenti al suo interno, è in grado di permettere al suo interno reazioni chimiche complesse che in altri ambienti, come quello subaereo non sarebbero possibili.

Fornisce nutrimento e sostentamento per le piante, permettendo la germinazione dei semi e la crescita delle piante, a loro volta fonte di cibo di organismi e uno dei primi elementi della catena alimentare. Quasi il 99% del cibo che consumiamo è prodotto direttamente o indirettamente dal suolo, che è determinante nel ciclo geo biochimico dei nutrienti. Permette la fissazione biochimica dell'azoto, uno degli elementi più volatili e più

difficile da fissare per molti organismi. Essenziale per le piante e per i loro processi.

Recentemente si è anche messa in luce la capacità del suolo di fissare la CO<sub>2</sub> rendendolo quindi una risorsa preziosa nella lotta all'effetto serra. Attraverso la microfauna, ma anche con reazioni chimiche che coinvolgono la sostanza organica e i minerali presenti, si è evidenziata la capacità del suolo di bloccare l'anidride carbonica trasformandola in composti organici inerti o in minerali.

Il suolo inoltre fornisce il supporto per le infrastrutture e i manufatti dell'uomo, anche se spesso questo comporta la sua copertura con cemento ed asfalti che ne causano la perdita per altri utilizzi più produttivi. Da esso si ricavano anche materiali come le argille per la produzione di ceramica e la torba, usata per la combustione o nella concimazione.

Un altro aspetto interessante è la caratteristica del suolo di essere in grado di conservare a lungo oggetti e manufatti. Il suolo è infatti il luogo dove si trovano la maggior parte dei reperti archeologici.

Nelle indagini le particelle del suolo con la loro tendenza ad essere asportate e la loro facilità di trasporto possono dare un utile aiuto agli investigatori nel trovare collegamenti o piste utili da seguire.

La genesi di un suolo è spesso un processo lento, che porta a una lenta e continua evoluzione di esso, che può anche permettere di riconoscere eventuali modifiche ambientali e climatiche verificatesi nel corso di migliaia di anni, attraverso lo studio delle sue particelle minerali, della fauna e dei resti organici contenuti.

All'interno del suolo si possono riconoscere vari strati o orizzonti, il cui numero dipende sia dalla tipologia dei processi che avvengono, sia dall'età dei suoli. I suoli più stratificati sono spesso i più complessi e maturi e hanno richiesto migliaia di anni per formarsi.

Tuttavia l'uomo con le sue attività è in grado di distruggere questi suoli in poche ore, determinando così uno squilibrio ambientale talmente grave da mettere in pericolo anche la sua stessa esistenza. Nei fatti negli ultimi tempi il consumo di suolo è aumentato al punto che ormai in molti territori si perde più suolo di quanto se ne produce (Fonti FAO e ESSC).

Il suolo si forma per effetto di vari processi chimici fisici ed organici che a volte richiedono anche migliaia di anni prima che gli effetti siano visibili.

Per conseguenza un suolo è molto più antico in funzione della quantità di orizzonti che si possono incontrare in esso rispetto ad un altro che ne presenta di meno.

Il punto di origine di un suolo sono le rocce che si trovano sulla superficie terrestre. Queste vengono inizialmente aggredite dagli agenti atmosferici e dai microrganismi, che con azioni meccaniche e chimiche ne provocano l'alterazione.

In questa fase si inseriscono quelle che vengono considerate le specie pioniere, licheni, batteri e funghi, che agiscono sulla roccia contribuendo ai processi di alterazione (weathering). I processi di degradazione delle rocce sono infatti chimici e fisici, dovuti all'azione dell'acqua, del vento e delle temperature su minerali che spesso si sono formati e stabilizzati in condizioni ambientali totalmente diverse da quelle che trovano sulla superficie terrestre. A queste azioni si vanno ad aggiungere i processi degradativi messi in atto dagli organismi tramite enzimi essudati, chelanti, acidi. Ma anche azioni meccaniche come l'attività delle ife fungine che sfruttando le superfici di discontinuità presenti nei minerali (fratture, superfici di contatto tra un minerale e l'altro, superfici di sfaldatura) ed esercitando forti pressioni contribuiscono a separare i singoli minerali o granuli che compongono la roccia formando il primo strato di alterazione sulla superficie della roccia.

Con il passare del tempo a questo primo strato di roccia e minerali alterati si unisce della sostanza organica proveniente dai resti degli organismi morti o portata sul luogo tramite gli agenti atmosferici, e lo strato iniziale si ispessisce sempre più permettendo l'insediamento delle prime piante e la graduale formazione di un suolo che con il passare del tempo diventa sempre più spesso e complesso.

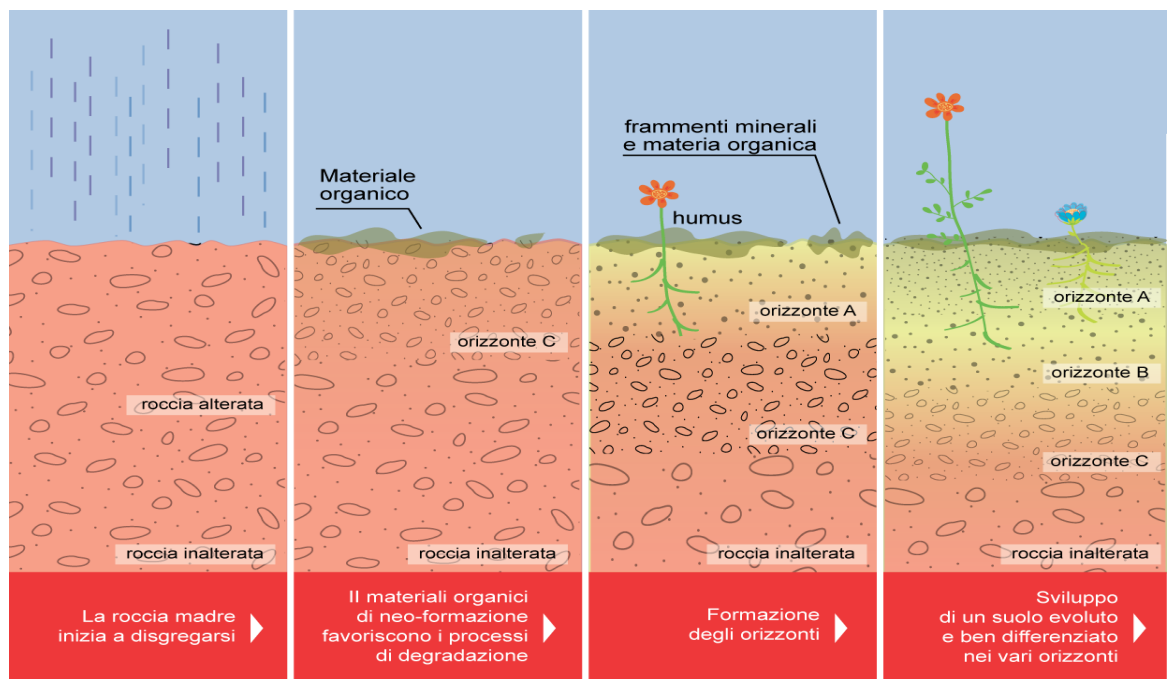


Fig. 1 Ciclo di formazione del suolo. (Google Images)

All'interno dei suoli possiamo distinguere tre orizzonti base che vanno dal basso verso l'alto. L'orizzonte R che è dove finisce il suolo e comincia la roccia inalterata. L'orizzonte C che è formato dalla roccia alterata più alcuni essudati che arrivano dagli orizzonti sovrastanti e infine l'orizzonte A formato da humus e sostanza organica più o meno decomposta.

A volte tra l'A e il C si crea con il passare del tempo un orizzonte intermedio detto B.

Questi orizzonti sono importanti sia perché danno un'idea dell'età di un suolo, sia perché tracciano anche una storia della sua evoluzione in base alla composizione che hanno e alla loro struttura e tessitura.

Nella formazione di un suolo sono quindi decisivi tre fattori: la litologia di origine, il clima e l'attività biologica.

## 1.2 Caratteristiche fisiche dei suoli

Il suolo, essendo un sistema trifasico e molto complesso, al punto che i suoi processi non sono ancora del tutto chiariti, presenta proprietà chimiche, fisiche e biologiche.

Le principali proprietà fisiche dei suoli sono:

Tessitura,

Struttura,

Densità,

Porosità

Ognuna di queste proprietà è importante e determina da sola o in combinazione con le altre differenze di comportamento dei suoli, di cui si deve tenere conto per non rischiare interventi sbagliati.

La tessitura, (texture) viene definita come la percentuale relativa delle particelle minerali comprese nella terra fine (<2 mm) caratterizzate da dimensioni specifiche. Si tratta di sabbia, limo e argille. Per determinarle si fa ricorso alle analisi granulometriche, effettuando setacciature con setacci standard che permettono di separare gradatamente le varie particelle di minerale in base alle dimensioni, fino a poter determinare la curva granulometrica e la tipologia di suolo tramite opportuni diagrammi. Per le particelle più fini il metodo abitualmente usato è la sedimentazione sfruttando la legge di Stokes (1851).

$$F_d = -6\pi\mu r v$$

Dove  $F_d$  è la forza di attrito viscoso,  $\mu$  è la viscosità,  $r$  è il raggio della particella e  $v$  è la velocità relativa tra particella e fluido.

La legge permette di ricavare il diametro della particella. Molti dei valori sono ormai presenti in tabelle ed altri applicativi, quindi quello che si fa è la misurazione del tempo che impiega il nostro campione a sedimentarsi.



La struttura invece è determinata dai processi che aggregano, cementano e compattano i costituenti del suolo. Dipende dalle dimensioni delle particelle che costituiscono il suolo e dal modo con cui si dispongono venendo a contatto tra loro.

La stabilità degli aggregati che si formano definisce la resistenza del suolo alla degradazione. Inoltre influisce sulla porosità, visto che determina sia la dimensione che la quantità dei pori.

Chiaramente uomo ed animali possono influire parecchio sulla struttura con le lavorazioni, che possono essere opportune e necessarie per migliorarla, oppure sbagliate e in genere sono le azioni meccaniche quelle che influiscono di più su di essa.

La porosità è la caratteristica che ha ogni suolo di possedere pori in grado di accogliere aria o acqua. La porosità è una qualità molto importante per un suolo, visto che consente gli scambi di fluidi. Esiste una porosità reale o efficace e una apparente. La differenza tra le due è data dal fatto che la porosità reale tiene conto dei pori che essendo intercomunicanti, permettono lo spostamento dei fluidi all'interno dei suoli, quella apparente invece include anche i pori non intercomunicanti. La porosità permette di ottenere due valori importanti ai fini agronomici. Uno è la porosità efficace, indicato come il volume di acqua rilasciato per gravità da un campione di suolo perfettamente saturo, mentre l'altro è la ritenzione specifica, definita come il rapporto tra il volume di acqua ritenuto da un campione di suolo saturo dopo aver effettuato il drenaggio per gravità, e il volume totale del campione. La porosità totale quindi, sarà data dalla somma di questi due termini, che come è ovvio sono sempre preseti entrambi in qualunque tipo di suolo.

La densità infine è il rapporto tra il peso e il volume di un campione di terreno. Si può distinguere tra una densità reale e una densità apparente.

La prima è il rapporto tra il peso del campione e il volume della frazione solida, quindi eliminando eventuali fluidi tramite essiccazione del campione e eliminando completamente i pori. Nella seconda invece il volume considerato è sia quello del solido che quello dei pori.

La densità di un terreno influirà sia sul tipo di lavorazioni necessarie, sia sulla coltivazione che sul deflusso delle acque che sull'infiltrazione ed è uno dei parametri essenziali per potere valutare le qualità di un suolo.

### **1.3 Caratteristiche chimiche dei suoli**

Tra le caratteristiche importanti dei suoli, le caratteristiche chimiche influiscono moltissimo su quasi tutte le attività del suolo e degli organismi che vi abitano. Sono essenziali per determinare tutta quella serie di scambi e reazioni chimiche che caratterizzano un suolo in salute e che ne determinano l'evoluzione.

Il ph è uno dei parametri più importanti di un suolo ed è anche uno dei più facili da determinare mediante l'uso dei Phmetri, dispositivi elettronici di rapido e facile utilizzo.

Il ph determina la concentrazione degli ioni idrogeno presenti in soluzione acquosa. Nel nostro caso la soluzione interagisce costantemente con le particelle del suolo, e quindi il ph si modificherà in conseguenza della composizione di esse, della presenza di ioni capaci di interagire con le particelle a carica positiva ma anche con quelle a carica negativa, dato che questi meccanismi di interazione sono fondamentali nel determinare il numero di ioni a carica positiva che rimangono in soluzione. Essenziali sono quindi le particelle argillose, dotate di superfici con ampia capacità di interazione con ioni, le particelle di humus, fortemente elettronegative, e i colloidali, a loro volta capaci di sviluppare forti interazioni con i cationi.

Le variazioni del ph di un suolo saranno determinate in sostanza dalla capacità delle particelle di interagire e dal potere tampone della soluzione circolante.

Anche il contenuto dei sali è molto importante. I sali oltre a determinare il contenuto degli ioni presenti nel suolo e a determinare la quantità e il tipo di elementi presenti. La quantità di sali presenti può determinare modifiche del suolo. In particolare elevate concentrazioni di essi determinano peggioramenti della struttura dei suoli, riduzione della capacità di scambio cationica, tossicità per le piante, anche in funzione dei tipi di sali presenti,

impossibilità per le piante di estrarre l'acqua dai micropori e variazioni del ph stesso.

Tra i sali particolarmente pericolosi sono i sali di sodio, NaCl in particolare. Il sodio infatti è particolarmente elettropositivo e con un raggio ionico molto ridotto. Di conseguenza si lega molto facilmente alle particelle argillose, creando un forte legame che solo con molta difficoltà e molta energia può essere spezzato. In un suolo argilloso l'arrivo di una soluzione ricca in cloruro di sodio determina la formazione di fenomeni di flocculazione, consistenti nella formazione di legami tra particelle argillose e ioni sodio, che essendo uno ione molto elettropositivo e con raggio ionico molto ridotto, in grado di legare a se le particelle argillose con molta efficacia e richiedendo un grande dispendio di energia per allontanarlo da esse.

La presenza di soluzioni fortemente saline nel suolo determina un forte incremento della tensione della soluzione e per conseguenza una maggiore difficoltà della pianta a estrarre acqua dal suolo.

Un sistema rapido per ottenere la salinità di un suolo è la conducibilità elettrica, dato che gli ioni trasmettono facilmente la corrente elettrica. La salinità è data da ioni differenti, che la rendono più o meno elevata. Diventa quindi interessante conoscere quali ioni sono presenti nel suolo, in quanto essi possono avere un'origine naturale, oppure essere presenti per via delle attività umane. Il tipo di ioni presente può spesso condizionare o pregiudicare le opzioni di recupero di un suolo.

Altro fattore importante per un suolo è la quantità di carbonati presente. I carbonati sono infatti i sali più facilmente reperibili nei suoli, in proporzioni variabili. La loro concentrazione in un suolo determina il valore del ph, che in presenza di elevate concentrazioni, si sposta verso valori decisamente basici, fino ad alcalini (da 6,5 a 8,5) . Spesso vengono

mescolati ai terreni acidi proprio per diminuirne l'acidità e renderla accettabile per le colture.

Il tenore in carbonati è in grado di influire anche sulle comunità biologiche, dato che funghi e batteri prosperano più o meno facilmente a seconda delle variazioni di pH. Anche la degradazione della sostanza organica è influenzata dal tenore in carbonati. In suoli calcarei, il processo di degradazione è infatti più lento. A dimostrare quanto siano importanti e interconnessi tra loro i vari parametri chimici, basta guardare alla sostanza organica. Si tratta di un parametro essenziale per l'attività biologica. Normalmente nei terreni agrari essa costituisce dall'1 fino al 3% del peso dei suoli, ma in suoli forestali si attesta tra il 5 e il 10% , anche se più spesso si trova un valore prossimo al 5% . In virtù di questa presenza si può considerare il suolo come un grande serbatoio di carbonio e quindi sono importantissime tutte quelle pratiche che tendono a stabilizzare il carbonio nei suoli, evitando che finisca nell'atmosfera sotto forma di gas, particolarmente CO<sub>2</sub>.

La sostanza organica non è tuttavia omogenea, ma composta da sostanze diverse tra loro. All'interno di esse possiamo distinguere resti vegetali ed animali, sostanze organiche instabili, che tendono a dare altri prodotti, sostanze organiche stabili. Menzione a parte poi va fatta per gli organismi viventi che, pur essendo parte della sostanza organica, tuttavia, costituiscono un'altra proprietà del suolo.

La sostanza organica stabile rappresenta tutte quelle sostanze che, ormai ha subito processi chimici e biologici tali da renderla non più degradabile. Viene comunemente detta humus ed è un componente essenziale dei suoli di cui migliora la struttura e contribuisce agli equilibri nutrizionali del sistema suolo pianta.

La capacità di scambio cationica CSC, o CEC, un parametro importante in quanto indicativo della capacità di interagire con ioni. Questi, presenti in

soluzione, interagiscono con le particelle argillose e con le molecole di sostanza organica, determinando così variazioni nelle caratteristiche dei suoli. La maggioranza dei suoli ha un pH da 5 a 8,5 ed è in questo range che avvengono le interazioni tra particelle del suolo e ioni.

Tra gli ioni i più diffusi sono calcio magnesio e potassio. Il sodio è, o almeno dovrebbe esserlo, tra i meno frequenti. Quando le sue concentrazioni sono elevate infatti, si hanno perdite di fertilità del suolo e danni alla struttura, dovuti alla forte capacità di interazione che il sodio ha con le particelle elettronegative.

Gli elementi che interagiscono con le piante sono moltissimi. Alcuni vengono detti macroelementi, in quanto la pianta ne ha grande bisogno e li assume in grandi quantità dal terreno. Azoto, Fosforo e Potassio sono i tre più importanti ed essenziali.

L'azoto è il più importante in quanto entra nella sintesi delle proteine e all'interno degli acidi nucleici. Nei suoli fino al 99% dell'azoto presente è di origine organica, tuttavia le piante assorbono più facilmente l'azoto inorganico. Per conseguenza nella disponibilità di questo elemento un ruolo determinante lo svolgono tutti quegli organismi che sono in grado di trasformare l'azoto organico in azoto minerale.

L'uomo interviene spesso in agricoltura con somministrazioni di azoto inorganico, tuttavia esso rimane disponibile per poco tempo e già nel 1982 uno studio di Gianniperi e Ciardi, metteva in evidenza come in un prato solo il 25% dell'azoto somministrato come concime era stato assorbito dalle piante e di esso la maggioranza dell'azoto somministrato si era trasformato in azoto organico mentre un'altra aliquota era andata perduta. La gran parte dell'azoto assorbito invece era quello nitrificato e reso disponibile dai microrganismi del suolo. Il che in realtà non stupisce molto, viste le recenti scoperte sui rapporti tra microrganismi e piante nella rizosfera.

Altro elemento importante per le piante è il fosforo. Nonostante le quantità necessarie e assorbite dalla pianta sono inferiori a quelle di elementi come azoto potassio e calcio, la sua partecipazione a molti processi essenziali della pianta, oltre al costituire sostanze essenziali per la pianta, fa sì che lo si consideri un macroelemento e spesso viene somministrato con le stesse metodologie di essi. Per il suo assorbimento però è essenziale il rapporto che la pianta instaura con i funghi simbiotici in quanto il fosforo mineralizza facilmente in composti insolubili, e spesso sono proprio i funghi i microrganismi che hanno la migliore capacità di mobilizzarlo ed assorbito, cedendolo poi alla pianta con cui hanno instaurato il rapporto di simbiosi.

Altri elementi sono essenziali, ma con dosaggi inferiori a quelli previsti per i macroelementi. Rame, ferro, molibdeno, zinco, manganese, sono tutti essenziali alle piante. Alcune coltivazioni richiedono anche il boro, ma sempre in quantità ridotte. Pur essendo importanti, spesso, a causa della somministrazione con i concimi, o perché presenti come impurità, stanno aumentando le concentrazioni nei suoli, superando in molti casi la soglia di tossicità. Determinanti si rivelano in questi casi le caratteristiche dei suoli, la presenza di soluzioni circolanti, il pH, la capacità di queste di portare in soluzione i cationi, la CSC, il tenore di sostanza organica, e naturalmente la fauna del suolo, più o meno sensibile alla presenza o meno di alcuni elementi, fermo restando che alcuni elementi chimici, come nichel e cadmio sono tossici con qualsiasi concentrazione.

## 1.4 Caratteristiche biologiche dei suoli

Il suolo oltre agli aspetti chimici e fisici, presenta caratteristiche biologiche importanti. La semplice massa degli organismi normalmente presente in un suolo è tale da far prendere in considerazione l'idea che assieme alle tre fasi tradizionali, occorre considerarne una terza: la *fase vivente* o *biofase*.

Le attività biologiche che si sviluppano, sono a loro volta perfettamente organizzate, come in una vera e propria società, allo scopo di ottenere dai minerali e dalle sostanze organiche inerti, ulteriore materia vivente, al punto da definirla anche come parte *solida organizzata*.

La struttura di base della materia vivente è la cellula, e molti degli organismi viventi del suolo sono unicellulari. In pochi microgrammi di terreno ve ne possono essere facilmente milioni, determinando l'assorbimento di ossigeno e il rilascio di anidride carbonica per effetto dei meccanismi metabolici e innescando così un vero e proprio meccanismo di respirazione, come se il suolo fosse un vero e proprio organismo vivente. A confermare la sensazione di avere a che fare con un organismo vivente è la presenza di fasi di assimilazione, come la fissazione dell'azoto e la sintesi del carbonio e la produzione di cataboliti, come la degradazione e la mineralizzazione della sostanza organica con formazione e accumulo di sostanze di riserva all'interno dell'humus.

Tutto questo avviene grazie alla presenza dei microrganismi e delle loro attività. Nonostante tutti gli studi fatti, oggi si è ancora lontani dall'aver identificato tutte le specie di microrganismi presenti nel suolo, e ad alcuni organismi pressoché ubiquitari, si affiancano organismi caratteristici di un singolo luogo e, a volte addirittura, di un singolo campione. Molto spesso è facile con le moderne tecniche di analisi molecolari, trovare da 50 a 100 milioni di microrganismi e in alcuni casi, anche fino ad un miliardo di



organismi per grammo di terreno secco. La maggior parte di essi sono microrganismi, funghi, batteri, protozoi, nematodi.

Tutti questi organismi convivono all'interno del suolo, tramite equilibri, a volte complessi e praticamente impossibili da riprodurre per l'uomo. È poi praticamente impossibile ripristinare quell'equilibrio, qualora l'uomo con le sue attività, finisca con il comprometterlo o distruggerlo. La conseguenza spesso è la perdita delle qualità del suolo e delle sue potenzialità colturali, che sono la conseguenza delle attività biologiche che in esso si svolgono. Questo avviene sempre più spesso, a causa dell'utilizzo di sostanze chimiche che, allo scopo di reprimere i patogeni delle piante, spesso inibiscono anche le attività di quei microrganismi che invece ne agevolano e migliorano la crescita e la produttività.

Fondamentale per le coltivazioni è la zona del suolo più prossima alle radici, che è anche spesso quella che riceve il maggior numero di interventi, non sempre adeguatamente mirati, la rizosfera. Essa si estende dai tessuti corticali delle radici fino a circa 50 cm dalle radici, o comunque fino a dove cessano le interazioni tra i microrganismi e la radice. In questa porzione di suolo vivono tutti quegli organismi che in qualche modo interagiscono con le piante e le loro attività, sia con influssi positivi, che negativi.

La maggior parte dei microrganismi che agiscono nella rizosfera, hanno un impatto positivo o nullo sulle piante, tuttavia in questa area si trovano anche gli organismi in grado di produrre danni alle piante. Da sempre per l'uomo è stato fondamentale il controllo su di essi, per evitare la perdita di raccolti agricoli, con importanti conseguenze sulla società.

## **1.5 Caratteristiche dei suoli siciliani**

La Sicilia per via delle sue condizioni climatiche ed ambientali è da sempre una terra con caratteristiche uniche in tutto quello che la riguarda. Per conseguenza non poteva essere diverso né per quanto riguarda la geologia, né per quanto riguarda i suoli.

In Sicilia si incontrano in affioramento litologie di tutti i tipi, sedimentarie, chimiche, vulcaniche e metamorfiche. Pochi posti al mondo presentano una analoga varietà litologica e morfologica.

Alcune rocce, in particolare argille e calcari sono molto diffuse e predominanti, altre si riscontrano in affioramento solo in alcune aree della Sicilia. Ad esempio il metamorfico, che si riscontra solo nella Sicilia Nord orientale, sui Monti Peloritani. I depositi chimici (evaporiti) sono presenti nella Sicilia centrale e il vulcanico è rappresentato dal Monte Etna, e nel settore Sud orientale dell'isola (Monti Iblei).

Le isole minori, poi presentano a loro volta una notevole varietà pedologica, risultato sia delle diversità litologiche che delle caratteristiche microclimatiche.

Il suolo più diffuso, specie nella Sicilia occidentale è il Vertisuolo. Ma più in generale sono i suoli a matrice argillosa a prevalere ed a rappresentare i tipi più produttivi per l'agricoltura locale, spesso contribuendo con le loro caratteristiche a una produzione agricola di qualità. La grande variabilità dei suoli, spesso è causa di problemi nella classificazione dei suoli.

Come spesso accade anche con le formazioni geologiche, anche i suoli sono in grado di modificare le proprie caratteristiche in uno spazio veramente ridotto, rendendo a volte problematica sia la classificazione, sia soprattutto la loro rappresentazione cartografica, dove spesso la necessità della rappresentazione cartografica si scontra con il livello di dettaglio richiesto.

I suoli siciliani non fanno eccezioni e la rappresentazione cartografica diventa sempre più complessa quanto più si scende nel dettaglio. L'attuale carta dei suoli della Sicilia, ad opera di Fierotti con la collaborazione di Dazzi e Raimondi e Liguori per quel che riguarda le litologie, è del 1988 nella sua prima stesura, ma in seguito è stata rivista più volte, nel 1997 e ancora nel 2007, fino a raggiungere un buon livello di accuratezza.

In essa Fierotti et alii, utilizzano i criteri di classificazione dell'USDA (United States Department of Agriculture) Soil Taxonomy.

In accordo con i dati geologici si può facilmente notare la suddivisione dell'isola in tre zone litologiche e pedologiche distinte.

Una costituita da litosuoli a matrice prevalente carbonatica, che si trovano principalmente nella parte nord occidentale dell'isola e in genere ovunque affiorano i rilievi montuosi della catena siciliana.

Adiacente ad essa troviamo i terreni a matrice argilloso arenacea che costituiscono la gran parte della Sicilia centrale e in cui troviamo i suoli più utilizzati a scopo agricolo.

Nella Sicilia orientale infine troviamo quei suoli che si formano in terreni vulcanici e metamorfici, e la cui localizzazione in questo settore è determinata da cause geologiche connesse con la genesi della Sicilia.

Altri fattori che determinano le caratteristiche dei suoli siciliani, sono il rilievo, le precipitazioni e il loro regime, le temperature, l'esposizione, e naturalmente l'uomo con le sue attività, che nel corso dei secoli sono diventate sempre più complesse e spesso non in armonia con gli equilibri della natura, oltre che sempre più in grado di modificarli.

## **CAPITOLO 2**

### **METALLI PESANTI**

## 2.1 Metalli Pesanti

I metalli pesanti sono un gruppo molto vasto di elementi normalmente presenti in natura, solitamente in quantità molto modeste, dell'ordine delle parti per milione (ppm).

La definizione di metallo pesante ha cominciato ad assumere importanza dagli anni settanta, man mano che la loro diffusione e concentrazione nell'ambiente andava aumentando e innescava fenomeni di inquinamento ambientale con caratteristiche peculiari. Emblematico in proposito il caso di inquinamento da mercurio di Myamata in Giappone. Un industria chimica, versava in mare ingenti quantitativi di mercurio, che avvelenavano il pesce e i molluschi, che poi, mangiati dagli abitanti andava ad accumularsi nel loro organismo con conseguenze gravissime e spesso letali. In effetti non esiste un esatta definizione di metallo pesante in quanto i criteri di identificazione di questi elementi sono stati basati esclusivamente sulla densità e sul numero atomico. Si indica infatti con il termine di metalli pesanti tutti quegli elementi che hanno densità mai inferiore a  $5 \text{ g/cm}^3$  e il numero atomico  $Z$  mai inferiore a 20.

Questa definizione per conseguenza fa comprendere tra i metalli pesanti elementi che vanno dal Sc (Scandio) fino agli elementi delle Terre Rare, come il Niobio. Questa definizione fa sì che vengano inseriti nel gruppo anche elementi che non presentano caratteristiche chimiche propriamente metalliche, come il selenio e l'arsenico, che dal punto di vista chimico vengono classificati come metalloidi, elementi cioè che presentano caratteristiche che sono un misto tra quelle dei metalli e quelle degli elementi non metallici (ad esempio possono essere duttili come i metalli, ma non conducono bene il calore o la corrente).

A causa di queste situazioni ibride, recentemente è stato proposto un nuovo criterio di classificazione basato sull'affinità maggiore o minore di questi

elementi a formare composti con l'ossigeno, oppure con lo zolfo e l'azoto, caratteristica questa molto più facilmente gestibile, e a cui aggiungere eventualmente anche un terzo gruppo comprendente quegli elementi capaci di sviluppare legami indifferentemente con tutti e tre gli elementi.

La struttura atomica di questi elementi si presenta con gli orbitali *d* solo parzialmente riempiti, e per conseguenza possono assumere diversi stati di ossidazione, che possono variare da  $1^+$  a  $7^+$ .

Questo permette loro di formare composti chimici diversi, a volte con proprietà totalmente divergenti; possono essere tossici se presentano un numero di ossidazione, o assolutamente non tossici se ne presentano un altro, come è il caso del cromo, tossico e cancerogeno quando si presenta come esavalente ( $6^+$ ) mentre il cromo trivalente ( $3^+$ ) è del tutto innocuo.

In biologia è particolarmente importante la concentrazione in termini di  $\mu\text{g}$ , in quanto attraverso questa distinzione si passa da elementi essenziali per gli organismi ad elementi tossici. E dal punto di vista biologico, in effetti, per qualunque sostanza più che parlare di tossicità, si dovrebbe parlare di livello di tossicità, dato che perfino l'acqua può essere tossica per un organismo se la concentrazione è tale da distruggerne l'equilibrio elettrolitico.

Quindici sono attualmente gli elementi considerati essenziali per gli organismi, se presenti alle concentrazioni ottimali, tra cui il rame e il ferro, mentre cadmio, mercurio, cromo e piombo sono considerati tra gli elementi tossici con qualsiasi concentrazione.

La tossicità è nota in alcuni casi fin dai tempi più antichi, ad esempio l'arsenico è stato utilizzato come veleno fin dall'antichità. Il piombo provoca una sindrome nota fin dall'antichità con il nome di saturnismo. D'altra parte, per altri ad oggi non si hanno indicazioni se siano tossici o meno, è il caso dello zirconio o dell'Ittrio, elementi molto rari nell'ambiente naturale, la cui concentrazione però sta aumentando in natura

ad opera dell'uomo e quindi non si può escludere un loro futuro inserimento tra gli elementi pericolosi.

L'attività dei metalli pesanti negli organismi avviene attraverso il loro assorbimento, che può avvenire per inalazione, attraverso la pelle, sotto forma di ossidi o elementi in polvere, o per ingestione attraverso la catena alimentare. Negli organismi viventi determinano disfunzioni dell'organismo legandosi ad enzimi e molecole essenziali per i processi vitali dell'organismo.

Questo avviene soprattutto per il fenomeno della vicarianza, cioè la capacità che hanno alcuni elementi di sostituirne altri in virtù della caratteristica di avere numeri di ossidazione e raggio ionico molto prossimi tra loro. Ad esempio piombo, rame e ferro possono spesso sostituirsi tra loro sia nei reticoli cristallini che in molecole complesse come gli enzimi, dove spesso questi elementi giocano un ruolo fondamentale e soltanto uno di loro svolge un ruolo utile per l'organismo. È noto ad esempio il ruolo che svolge il ferro nel legare l'ossigeno alla molecola dell'emoglobina. Se al posto del ferro, v'è un atomo di rame, o peggio uno di piombo, la molecola non lega più gli ossigeni e questo determina l'impossibilità da parte dell'organismo di usare l'ossigeno o di veicolarlo al suo interno, con conseguenze che possono portare anche alla morte.

È quindi molto importante la gestione di questi elementi per evitarne l'accumulo nel terreno in concentrazioni pericolose e la conseguente diffusione nell'ambiente.

## 2.2 Ciclo dei Metalli Pesanti

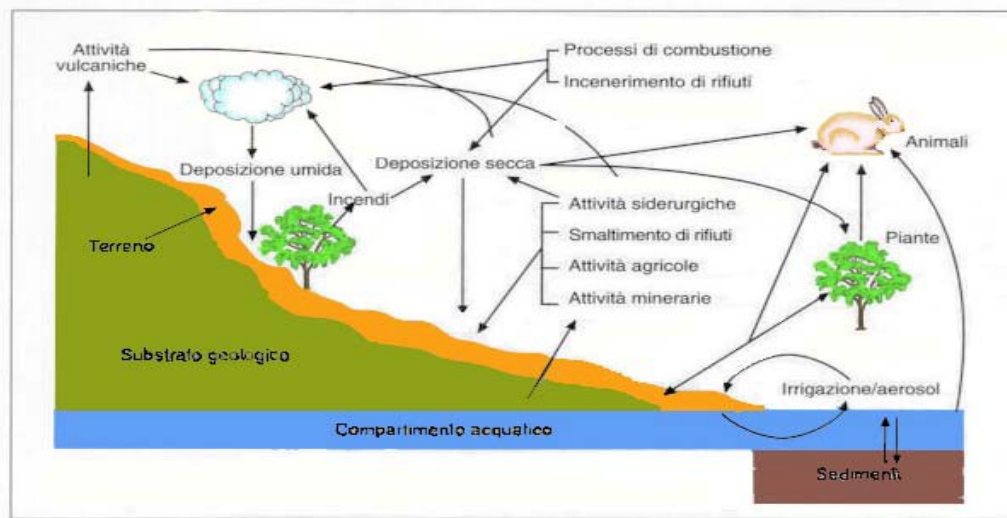


Fig. 2 Ciclo dei metalli pesanti nell'ambiente (Google immagini.)

I metalli pesanti non sono sostanze chimiche create e introdotte dall'uomo nell'ambiente, ma elementi chimici presenti da sempre in natura e facenti parte dell'ecosistema, nel quale interagiscono con effetti anche benefici, contribuendo all'equilibrio generale dell'ambiente.

Come altri elementi presenti sul nostro pianeta, acqua, piante, animali, presentano un loro vero e proprio ciclo, il cui punto di partenza è all'interno della terra. Gli elementi chimici presenti sulla terra provengono infatti tutti da un fuso noto con il nome di magma, all'interno del quale si trovano. Questo fuso risalendo verso la superficie terrestre si raffredda e forma le rocce magmatiche o ignee. Alcuni elementi, particolarmente volatili fuoriescono da questo fuso sotto forma di gas e si disperdono nell'atmosfera, attraverso le manifestazioni vulcaniche. Questi gas possono contenere al loro interno una piccola quantità di metalli pesanti, sotto forma di polveri finissime, ma si tratta di quantità molto esigue e da lì vengono disperse e raggiungono il suolo, dove si depositano e vengono catturate dalle particelle del suolo, argille e sostanza organica, oppure



attraverso le soluzioni circolanti nel suolo si infiltrano e raggiungono le falde idriche.

Se restano in superficie possono essere asportati dalle acque di ruscellamento e attraverso fiumi e torrenti raggiungere il mare o un lago in cui si depositano sul fondo.

La maggioranza degli elementi tuttavia resta all'interno del magma e man mano che il fuso cristallizza e solidifica va a formare i minerali che caratterizzano le rocce.

Alla superficie terrestre molti minerali si trovano in condizioni di temperatura pressione e ambientali diverse da quelle in cui si sono formati, e questo ha come conseguenza una certa instabilità del reticolo cristallino. I cicli di gelo e disgelo, l'azione dell'acqua piovana e di ruscellamento, spesso in azione combinata con le sostanze chimiche presenti in soluzione in essa contribuisce alla rottura dei reticoli cristallini, consentendo l'ingresso di questi metalli nell'ambiente. Tuttavia, data la grande lentezza di questi processi, le concentrazioni di questi elementi per azione dei processi naturali, non raggiungono mai livelli pericolosi per gli organismi.

Il ciclo naturale di questi elementi però oggi si è arricchito di un'altra voce: l'uomo e le sue attività.

Con il progresso tecnologico infatti l'uomo ha sempre più cominciato a sfruttare e utilizzare questi elementi, estraendoli dalle rocce, lavorandoli nelle industrie e sbarazzandosene a fine utilizzo senza valutare una vera procedura di recupero e riutilizzo.

Data la velocità delle attività umane rispetto ai cicli naturali, si è avuto un forte aumento delle concentrazioni di questi elementi nell'ambiente con il conseguente raggiungimento di quei livelli di concentrazione che risultano tossici per la maggioranza degli organismi e che, alla lunga, provocano effetti anche sull'uomo.

Nel processo di inquinamento sono coinvolte un po' tutte le attività umane, dall'attività estrattiva fino all'agricoltura. I metalli pesanti infatti vengono utilizzati in moltissime attività. Sono presenti nelle vernici, negli imballaggi, nei pesticidi, nei fertilizzanti, spesso come impurità, nei carburanti, nelle materie plastiche, nelle leghe metalliche, nei processori dei computer, persino nei farmaci, visto che alcuni in opportuni dosaggi sono utili agli organismi. Le modalità di trasporto di questi inquinanti sono di solito l'acqua e l'aria, sotto forma di soluti e polveri, Molto più raro sotto forma di composti chimici, ma molto dipende dalla capacità di reazione del singolo elemento. Rame e piombo ad esempio, interagiscono molto facilmente e formano facilmente composti chimici. Cesio e alluminio invece formano ossidi molto facilmente, si legano alla sostanza organica presente nei suoli e spesso diventano quasi inamovibili dal substrato.

## 2.3 Il Rame



Fig. 3 Pepita di rame nativo. (Google immagini)

Il rame è l'elemento chimico con numero atomico  $Z$  29. Sulla tavola periodica lo si trova tra il nichel e lo zinco e nella stessa colonna di argento e oro. Non è un caso, in quanto questi tre elementi si trovano spesso insieme e formano anche leghe metalliche. Rispetto a questi due elementi è un po' più presente in natura, e in passato era molto facile anche trovare miniere di rame nativo, cioè non legato in composti chimici con altri elementi.

È uno dei pochi metalli che si presenta colorato allo stato naturale, la maggioranza dei metalli o sono del tutto incolori o si presentano con tonalità di grigio. Il colore varia dal rosa al rosso intenso. Esposto agli

agenti atmosferici si ricopre di una patina di ossido brunastro che con il passare del tempo diventa verde azzurra (verderame). Questo lo rende molto resistente alla corrosione, analogamente all'alluminio, in quanto lo strato ossidato rallenta e impedisce la corrosione del metallo.

È un ottimo conduttore di corrente e calore, superato solo dall'argento, non è magnetico e inoltre è batteriostatico, in quanto non permette la proliferazione dei batteri sulla sua superficie. Si lavora facilmente, duttile e malleabile. Fonde a 1085 °C. Si ricicla molto facilmente con altissime percentuali di recupero. Attualmente forma più di 400 leghe con altri metalli, ma le più conosciute, anche perché sono le più antiche, sono il bronzo e l'ottone ottenute rispettivamente con lo stagno e lo zinco.

Il rame presenta due stati di ossidazione in natura,  $1^+$  e  $2^+$ . Esistono anche il rame  $3^+$  e  $4^+$ , ma a causa dell'elevata energia necessaria per formarli sono stati ottenuti solo artificialmente, allo scopo di ottenere dei superconduttori, mentre in natura si sono trovati solo in alcuni composti organometallici presenti in alcune proteine.

Come molti altri elementi il rame presenta alcuni isotopi, ma solo due di essi sono stabili, gli altri sono tutti altamente radioattivi e con tempi di dimezzamento tali da dare loro un'emivita di un minuto o poco di più. Gli isotopi più comuni sono il  $^{63}\text{Cu}$  e il  $^{65}\text{Cu}$ .

Solo raramente lo si trova in natura come elemento singolo. Quando questo avviene, analogamente all'oro, lo si trova sotto forma di pepite. Diversamente dall'oro è in grado di formare più facilmente legami con altri elementi e quindi entra facilmente nei reticoli cristallini sia come elemento dominante ed essenziale per la genesi del minerale, sia come impurità o elemento sostitutivo (vicariante) di altri elementi come Fe, Mg, Ca, Zn, Pb e altri ancora. I minerali di rame più presenti in natura sono gli ossidi e i solfuri di rame. Tra questi ultimi, il minerale pirite è anche noto come "l'oro degli sciocchi", in quanto la sua lucentezza giallastra può trarre in

inganno chi non lo conosce. I solfati, sono invece i minerali che più spesso vengono utilizzati a scopo estrattivo, in quanto è molto più facile rimuovere il rame da essi e sono più abbondanti.

In tempi recenti per migliorare l'estrazione del rame si è fatto ricorso anche all'utilizzo di batteri riducenti ottenendo così un miglioramento della produzione e abbattendo l'inquinamento ambientale derivante dai processi estrattivi, in precedenza prevalentemente chimici.

Il rame in biologia è importante nel metabolismo. Nell'uomo e nelle piante agevola la crescita e lo sviluppo. Inoltre opera a livello del cervello, del sistema nervoso e nel sistema cardiovascolare.

Ben trenta enzimi diversi contengono rame al proprio interno. Inoltre vista la sua presenza in molte proteine, finisce con essere indispensabile anche per altre attività biologiche o è comunque presente. Non si conoscono malattie professionali legate al rame, ma vi sono due malattie genetiche che ne impediscono rispettivamente l'escrezione e l'assorbimento, determinando in entrambi i casi gravi squilibri metabolici.

## **2.4 Storia del rame e suoi usi**

Il rame è uno dei metalli più noti fin dall'antichità ed è stato il primo metallo ad essere lavorato dall'uomo. Si conoscono manufatti in rame che sono stati datati all'8700 A. C. La sua facilità di lavorazione, che ne permette la lavorazione anche a freddo, ha fatto sì che anche gli indiani nordamericani hanno realizzato manufatti in rame, visto che, non erano in grado di lavorare tutti quei metalli che invece richiedono la fusione e la lavorazione a caldo.

Il suo utilizzo nell'antichità ricopriva quasi ogni aspetto delle attività umane, dalla produzione di vasellame ai gioielli fino alle armi. Il suo utilizzo, che non è mai cessato, si è andato modificando con il passare dei secoli, durante i quali ha segnato un intero periodo della storia umana, definito infatti "Età del Rame".

Questa epoca segna il momento in cui l'uomo inizia a passare dalla lavorazione della pietra per ottenere utensili, alla lavorazione dei metalli.

Non è facilmente individuabile il momento preciso in cui gli uomini iniziarono a sfruttare e a estrarre il rame per lavorarlo, sia per i pochi ritrovamenti che per la mancanza di veri e propri documenti scritti, ma anche in quanto esso avvenne in posti diversi e in periodi diversi, anche se molto prossimi tra loro.

L'area di partenza, da cui provengono finora i ritrovamenti più antichi, sembra collocarsi in Asia, in particolare nelle regioni interne della Turchia, ma almeno inizialmente sembra che il rame non abbia subito scalzato la pietra nella creazione dei manufatti.

I problemi infatti legati alla sua estrazione, spesso limitavano l'uso al solo rame nativo che è più difficile da trovare. Sembra inoltre che in alcune aree il rame e il bronzo abbiano coesistito per parecchio tempo e che, il

passaggio dal metallo alla sua lega, il bronzo, sia stato in effetti, molto più graduale di quanto inizialmente si pensasse.

In Europa sembra si sia cominciato a produrre manufatti in rame già dal III sec. A. C. ma sulla costa atlantica sembra essere l'oro ad essere usato più frequentemente del rame.

L'Asia del sud invece, sembra essere il luogo dove per primo si cominciò a lavorare il rame, mentre gli indiani del Nord America iniziarono a lavorare il rame solo dopo il contatto con l'uomo bianco.

Il rame oltre ad essere il primo metallo ad essere stato lavorato dando il via alla metallurgia, è stato anche il primo metallo a dare il via alle leghe.

Mescolando insieme infatti rame e stagno in opportune proporzioni, si ottiene il bronzo, che darà il via definitivo all'uso dei metalli da parte dell'uomo.

A quanto sembra non si ha però un limite netto tra i due periodi. La produzione di utensili in rame e utensili in bronzo per molto tempo proseguirà senza che vi sia un abbandono del rame, abbandono del resto mai avvenuto.

Nel mediterraneo l'uso del rame si diffonde attraverso il commercio con l'Anatolia, e nell'Egeo con i Greci. Successivamente, con la scoperta di ricche miniere nell'isola di Cipro, da qui il nome dato all'isola (dal latino Cuprum), inizia la produzione di manufatti anche nel bacino del mediterraneo e il suo utilizzo e, per conseguenza anche quello del bronzo va aumentando, mentre l'uomo inizia così a sviluppare la scienza che si chiama metallurgia.

Le prime difficoltà con il rame si hanno nel momento in cui venendo a mancare le fonti di rame nativo, inizia a diventare difficile procurarselo, fino a quando non vengono messe a punto le tecniche di estrazione dagli ossidi, dai solfuri e dai solfati.

Uno dei metodi migliori per procurarsi il rame diventa così riutilizzare quello già esistente.

Oggi per estrarre il rame si fa ricorso pure ai solfo batteri, in grado di degradare solfati e solfuri per estrarre lo zolfo, che usano per le loro attività biologiche, con grande risparmio di energia e minori rischi di inquinamento rispetto alle tecniche chimiche tradizionali. Anche la resa risulta migliore, grazie all'efficienza dei microrganismi.

Con il passare del tempo la produzione di rame riprende ad aumentare e i suoi utilizzi si diversificano. Oggi trova largo impiego nell'elettronica, in quanto metallo altamente conduttivo per elettricità e calore. Solo l'argento e l'oro ottengono valori migliori, ma sono più costosi. Si usa molto anche in lega con l'oro nella realizzazione di gioielli, in particolare, e in oreficeria è ancora oggi un metallo molto apprezzato, ma altrettanto apprezzati in oreficeria sono azzurrite e malachite, minerali di alterazione del rame con cui si realizzano anelli, cammei e altri gioielli grazie al loro colore azzurro o verde.

Grazie alle sue qualità elettriche è utilizzato come base nella realizzazione di superconduttori, in lega con altri elementi chimici, e per produrre cavi elettrici e telefonici. La sua resistenza alla corrosione, che verrà poi sfruttata per produrre un'altra lega, l'ottone, lo ha reso utile nella produzione di tubi per il trasporto dell'acqua, anche perché impedisce la proliferazione dei batteri.

Recentemente poiché il suo costo è andato aumentando lo si è sostituito con tubi in materiale plastico, ma si trova ancora in commercio.

Conduce bene anche il calore e anticamente si usava pure per produrre prodotti per la cucina come pentole e stoviglie varie.

Per le sue qualità di fungicida e battericida viene usato in agricoltura sotto forma di solfato di rame o come verderame.



Essendo un elemento, è facilmente recuperabile al 100% e quindi negli ultimi tempi oltre al rame ottenuto per estrazione dalle miniere è cominciato ad apparire sul mercato anche il rame recuperato da manufatti, elettrodomestici e altri materiali. Le tecniche di recupero ovviamente variano a seconda della provenienza ma il recupero è molto vantaggioso, anche perché il prezzo attuale del rame è di 8 euro al Kg e va aumentando, tanto da provocare anche ripetuti furti di cavi di rame a danno delle aziende elettriche o di altri prodotti e materiali che ne contengono in buona quantità e facilmente recuperabile. Spesso infatti la tecnica di recupero è semplicemente dare fuoco ai cavi per rimuovere la guaina isolante e recuperare il metallo velocemente.

## 2.5 Il rame in agricoltura

Il rame, è un metallo con caratteristiche molto interessanti che ne permettono un grande utilizzo in molti settori, e interagisce molto sia con l'ambiente in cui viene a trovarsi, sia con gli organismi.

Appartiene a quel gruppo di elementi la cui tossicità dipende dalla concentrazione e che nelle quantità adeguate risulta invece essenziale per gli organismi, al punto che una carenza eventuale può provocare squilibri metabolici anche gravi, così come un sovradosaggio.

In particolare tra gli animali, le pecore sono particolarmente vulnerabili all'avvelenamento da rame, che colpisce particolarmente il sistema nervoso. Quindi risulta essenziale evitare il pascolo di questi animali in aree inquinate da questo metallo per prevenirne le conseguenze.

Le piante assorbono il rame attraverso le radici e lo utilizzano nelle loro attività metaboliche. Una carenza di rame può fortemente influire sullo sviluppo della pianta e sulla sua crescita, fino anche a provocare danni alla fase di produzione e fruttificazione.

L'eccesso del rame tuttavia, causato da un forte inquinamento del suolo, provoca estesi fenomeni di clorosi sulle foglie e avvizzimento. Inoltre essendo un elemento che le piante sfruttano abitualmente, l'assorbimento in concentrazioni elevate è molto più facile che con elementi metallici più tossici e più pericolosi, per i quali le piante hanno spesso elaborato meccanismi di protezione come l'isolamento in compartimenti o l'assorbimento per poi espellerli attraverso le aperture stomatiche nell'atmosfera, come fa la pianta del tabacco con il mercurio ad esempio.

Altre piante sfruttano le simbiosi con i funghi per difendersi dagli inquinanti. I funghi infatti sono in grado di agire quasi come un filtro, catturando questi elementi con le loro ife, e bloccandoli con sostanze chelanti, oppure fornendoli alla pianta in quantitativi che le permettono di

usufruire dei vantaggi che le derivano dalla disponibilità dell'elemento, senza però subire conseguenze di un sovradosaggio. In cambio il fungo ottiene zuccheri e altre sostanze nutritive che non è in grado di sintetizzare. Concentrazioni elevate di rame al punto da risultare tossiche, sono molto rare in natura e solitamente dovute a situazioni geologiche particolari, come può essere la presenza di giacimenti minerari, oppure il trasporto di ioni rame ad opera delle acque che lo asportano dal luogo di origine. Più frequentemente l'accumulo di rame ha origini antropiche e per conseguenza il livello di tossicità si raggiunge in poco tempo. Ad esempio, con un vigneto a lavorazione convenzionale, bastano circa vent'anni per avere livelli di concentrazione del rame che, pur non provocando danni al vigneto, rendono tossico il terreno qualora si cambi tipo di coltivazione. Altro problema spesso connesso alla presenza del rame è la presenza di altri metalli più tossici, come nichel e piombo. In agricoltura il rame è spesso usato con vari nomi sotto forma di solfato, e nei solfati è facile trovare questi due elementi come impurità. Il frequente utilizzo del rame come antiparassitario e fungicida, determina l'accumulo oltre che del rame, anche di quegli elementi che sono frequentemente presenti nei solfati al posto del rame come vicarianti. Diventa quindi importante una corretta gestione del rame in agricoltura, non solo per prevenire un inquinamento da rame, ma anche un eccessivo accumulo di quei suoi vicarianti la cui soglia di tossicità è molto più bassa del rame.

## 2.6 Attività biochimica del rame

A differenza di molti altri elementi metallici che non partecipano ai processi biologici, il rame è un elemento spesso essenziale per il metabolismo degli organismi. La sua presenza in molte molecole ed enzimi che svolgono funzioni biologiche essenziali è ormai nota, così come l'importanza dell'evitare una sua sostituzione all'interno di queste molecole da parte di altri elementi, che ne pregiudicano il funzionamento.

Il rame entra negli organismi sotto forma di  $\text{Cu}^{2+}$ , forma in cui è facilmente solubile, e la sua attività biochimica sembra che sia iniziata solo dopo che l'atmosfera terrestre cambiò la sua composizione, arricchendosi di ossigeno. Questo perché quasi tutte le reazioni del rame avvengono in presenza di ossigeno o con l'ossigeno come accettore di elettroni. Un'ulteriore conferma viene dal fatto che nei batteri anaerobici non si hanno proteine contenenti rame, e la sua tossicità nei confronti di alcuni organismi, unita con la sua bassa soglia di accumulo negli organismi superiori, uomo compreso, confermerebbe la sua relativa giovinezza come elemento biochimico.

Il rame può avere nelle molecole una configurazione tetraedrica oppure quadrato planare, a seconda se si presenta come  $\text{Cu}^{1+}$  oppure come  $\text{Cu}^{2+}$  rispettivamente.

Per conseguenza  $\text{Cu}^{2+}$  è un ossidante più forte rispetto al monovalente che di solito forma legami con lo zolfo (S) piuttosto che con l'ossigeno (O).

Nell'uomo normalmente si riscontrano 110 mg per un peso di 70 Kg e in genere ne assumiamo 2 mg al giorno, assorbendolo nel sangue nelle ossa e nel fegato nei reni e nel cuore. Il maggiore contenuto si ha nelle ossa. Nel sangue si lega alla ceruloplasmina e all'albumina. La sua carenza genera anemie, mentre l'impossibilità di espellerlo genera una sindrome rara nota come sindrome di Wilson che causa una degenerazione epatolenticolare del

fegato. Inoltre si ritiene che vi siano correlazioni tra il rame nell'organismo e il morbo di Alzheimer e alcuni tipi di sclerosi laterale amiotrofica, ma al momento non è ancora chiaro il collegamento.

Il rame è in grado di formare tre tipi diversi di proteine. Il tipo 1 è anche noto con il nome di proteine blu del rame e presenta lo ione metallico al centro di un tetraedro distorto.

Più in generale il rame si trova negli enzimi laccasi tirosinasi e nell'emocianina, una molecola presente negli artropodi e nei calamari, dove svolge una funzione analoga a quella dell'emoglobina umana, e in molti amminoacidi.

Il riconoscimento delle proteine è molto facile tramite l'assorbimento spettrale, visto che i singoli legami presentano valori differenti tra loro e facilmente distinguibili nelle bande spettrali.

Il rame si presenta con due stati di ossidazione, e in biochimica, molto spesso si presenta con stato di ossidazione  $1^+$ , mentre nei minerali tende a prevalere lo ione  $2^+$ , questo potrebbe essere dovuto al fatto che lo ione  $2^+$  conferisce all'elemento una maggiore stabilità all'interno dei reticoli cristallini e quindi una maggiore capacità di resistenza della struttura cristallina alle sollecitazioni esterne, permettendo al minerale di resistere meglio ai processi di degradazione chimica.

Lo ione  $1^+$  invece permette all'elemento una maggiore reattività e quindi la possibilità di svolgere ruoli di scambio e come legante nelle proteine e negli enzimi, come ad esempio la capacità che ha di svolgere un ruolo analogo a quello del ferro nell'emoglobina, legando a sé gli ossigeni e rilasciandoli.

Alcuni autori, ritengono che l'utilizzo del rame nell'emocianina, sia stato il primo sistema usato dagli organismi per veicolare l'ossigeno nel tessuto sanguigno, poi sostituita con l'emoglobina e con il ferro, risultati più efficaci in organismi che evolvendosi diventavano via via più complessi. In

alcuni organismi, come i polpi, sarebbe rimasta perché sufficiente per le loro necessità fisiologiche.

Il rame spesso interviene nelle fasi della crescita e della maturazione dei frutti, anche se ancora molti meccanismi non sono stati del tutto chiariti, ad esempio se ha un ruolo attivo nelle reazioni chimiche, oppure si limita a svolgere un compito di catalizzatore, senza partecipare direttamente alla reazione.

## **2.7 Inquinamento da rame**

L'inquinamento da rame per molto tempo è risultato essere un fenomeno molto localizzato e in genere limitato alle aree prossime alle miniere di questo minerale e di solfuri in genere, nei quali spesso sostituisce come vicariante altri elementi chimici, a volte anche più pericolosi.

Tuttavia le sue qualità positive sono tante e spesso ben note fin dall'antichità, ad esempio le sue qualità come battericida.

Per conseguenza è impiegato in agricoltura come antiparassitario, di solito sotto forma di solfato di rame, in quasi tutte le coltivazioni. In agricoltura biologica è poi addirittura essenziale, visto che, anche se il suo uso viene sempre più ridotto, è comunque l'unico antiparassitario e fungicida ammesso, decisivo nella lotta alla peronospora. La quantità consentita è di 6 Kg per ettaro di terreno, in agricoltura biologica, ma l'Unione Europea intende ulteriormente ridurre il quantitativo per poi arrivare a eliminarlo completamente negli anni a venire.

Le ragioni di questa scelta, sono molto semplici. Il rame, pur essendo un elemento tossico solo ad elevate concentrazioni, tende a formare legami molto forti con le particelle argillose e con la sostanza organica dei suoli, modificando i reticoli cristallini e i legami chimici. Così facendo tende a rimanere nel suolo, concentrandosi negli strati più superficiali, piuttosto che scendere in profondità. Essendo in grado di interagire con la sostanza organica, può renderla non utilizzabile dai microrganismi o formare con essa composti tossici.

L'azione tossica del rame si manifesta di più sulle comunità microbiche e su altre specie del micro mondo, mentre per i funghi, spesso dipende dal fungo in oggetto. Alcuni sono meno sensibili di altri. Inoltre i funghi sono capaci di assorbire il rame concentrandolo nelle pareti cellulari, riducendone l'effetto dannoso, oppure attraverso l'uso di enzimi e proteine,

sono in grado di produrre chelati, che catturano il rame e lo immobilizzano all'interno della molecola, come fanno anche per il ferro allo scopo di sottrarlo a specie antagoniste, impedendone l'utilizzo e quindi anche riducendo la possibilità di competizione, mentre nel caso del rame lo scopo è evitare di essere avvelenati dall'accumulo di questo.

In un lavoro del 2010 Guixin Chu, Steven A. Wakeline, Leo Condrón e Alison Stewart hanno notato come l'azione del rame sia particolarmente forte sulle comunità batteriche del suolo, mentre l'azione sui funghi è molto più ridotta. Poco sensibili al rame risultano in modo particolare *Fusarium* e *Trichoderma*, con quest'ultimo che dimostra una grande capacità di neutralizzazione del rame, sotto forma di solfato. L'effetto prevalente è quello di riduzione delle comunità microbiche e fungine, non solo in termini di numero, ma anche di varietà specifica.

Altro fattore di cui tenere conto è che il rame si mantiene negli strati superficiali, formando legami stabili con le particelle del suolo. Per conseguenza la sua concentrazione aumenta nel tempo fino a raggiungere livelli di tossicità del suolo elevati. I vigneti sono particolarmente esposti al rischio di inquinamento da rame. Esso viene usato sotto forma di solfato di rame come antiparassitario e per prevenire infestazioni di funghi, solitamente spruzzato come soluzione nebulizzata, raggiunge il terreno, dove anno dopo anno si accumula aumentando la concentrazione. Le viti sono piante molto resistenti, e non subiscono conseguenze anche in presenza di elevate concentrazioni di rame.

Nel momento però in cui si sostituisce un vigneto con un'altra coltura, spesso il livello di concentrazione di rame nel suolo può essere talmente elevato da rivelarsi tossico per la coltura che si vuole impiantare e questo può causare un grave danno. Inoltre occorre tenere conto anche del fenomeno della vicarianza. All'interno del solfato di rame si possono



trovare oltre al rame anche altri elementi come nichel piombo ferro magnesio, stagno o cadmio.

Sono infatti tutti elementi che possono sostituire il rame nei reticoli cristallini e quindi possono a loro volta essere presenti all'interno del prodotto utilizzato, e attraverso le irrorazioni raggiungere a loro volta il suolo inquinandolo. Il problema non può essere sottovalutato, in quanto alcuni di essi sono già tossici a concentrazioni molto ridotte, nell'ordine delle ppm, e la loro pericolosità non si limita alle piante, molto spesso vale anche per gli animali e per l'uomo.

In alcuni casi, l'elemento può non essere tossico per le piante, ma può esserlo per l'uomo e gli animali che si cibano delle piante inquinate.

## **Capitolo 3**

### **Funghi del Suolo**

### 3.1 Funghi del suolo

I Funghi del suolo sono una classe di organismi pluricellulari complessi molto vasta.

In genere viene definito comunemente fungo solo una parte dell'organismo, quella più appariscente, nota come carpoforo e che rappresenta in realtà solo una piccola parte del fungo vero e proprio, il frutto. Per molti anni questo e i caratteri morfologici visibili sono stati la base della classificazione sistematica, sia per gli appassionati che per gli esperti. La conseguenza è stata che molta attenzione si è focalizzata sugli Ascomiceti e sui Basidiomiceti, mentre altri funghi erano poco conosciuti o addirittura non considerati tali. Ben presto ci si è accorti però che i soli caratteri morfologici spesso non permettono un'identificazione certa, soprattutto quando si scende nel dettaglio, a livello di genere e specie.

Si è passati, con il progredire della tecnica ad analisi biochimiche degli enzimi e successivamente alle mappature genetiche. Tecniche come l'elettroforesi delle proteine e i marker genetici, ormai perfezionati e di facile applicazione tramite l'uso di kit appositi, sono alla portata di qualsiasi laboratorio di microbiologia e hanno consentito da una parte, di evidenziare la grandissima variabilità specifica dei funghi, e, d'altra parte la grande difficoltà di una classificazione sistematica, soprattutto a livello di specie. La quantità di specie sconosciute è virtualmente enorme e si scoprono costantemente nuove specie, spesso con caratteri morfologici simili, che a volte, solo al microscopio elettronico possono essere individuati.

La classificazione dei funghi, partita con Linneo (1753), presenta il primo vero studio sistematico di questi organismi così peculiari, nell'opera di Saccardo (1882 – 1931) che si può definire la prima vera enciclopedia micologica. Con lui inizia la prima suddivisione in quattro grandi gruppi,

anche se di essi, soprattutto i Basidiomiceti sono quelli più studiati, data la presenza di corpi fruttiferi e la loro importanza, anche economica. Tuttavia il testo presenta anche una ulteriore pecca, in quanto, in accordo con Linneo, colloca i funghi nel Regno Vegetale. Occorrerà ancora del tempo prima che si prenda atto che i funghi hanno più affinità con gli animali che con le piante, e ancora altro tempo prima della loro definitiva affermazione come quinto regno. Nel 1981 Cavalier - Smith lancia per la prima volta l'idea di creare un Quinto Regno per quelli che lui definisce Funghi Superiori (Ascomiceti, Basidiomiceti, Zigomiceti e le loro forme asessuate raggruppate come Deuteromiceti), mentre quelli che lui definisce Funghi inferiori (monocellulari o ad ife con spore dotate di flagelli), vengono trasferiti nei regni dei Protista e dei Chromista. Con questo lavoro si prende anche atto per la prima volta che i funghi hanno più affinità con gli animali che con i vegetali, gettando così le basi per il loro definitivo allontanamento dal Regno Vegetale. Le idee di Cavalier – Smith vengono poi riprese da Kendrick nel 1996 e successivamente lo stesso Cavalier – Smith nel corso degli anni sviluppa modelli del Quinto Regno sempre più dettagliati (1993, 1998, 2004, 2006) che poi vengono ripresi nel 2007 da Hibbett e Binder.

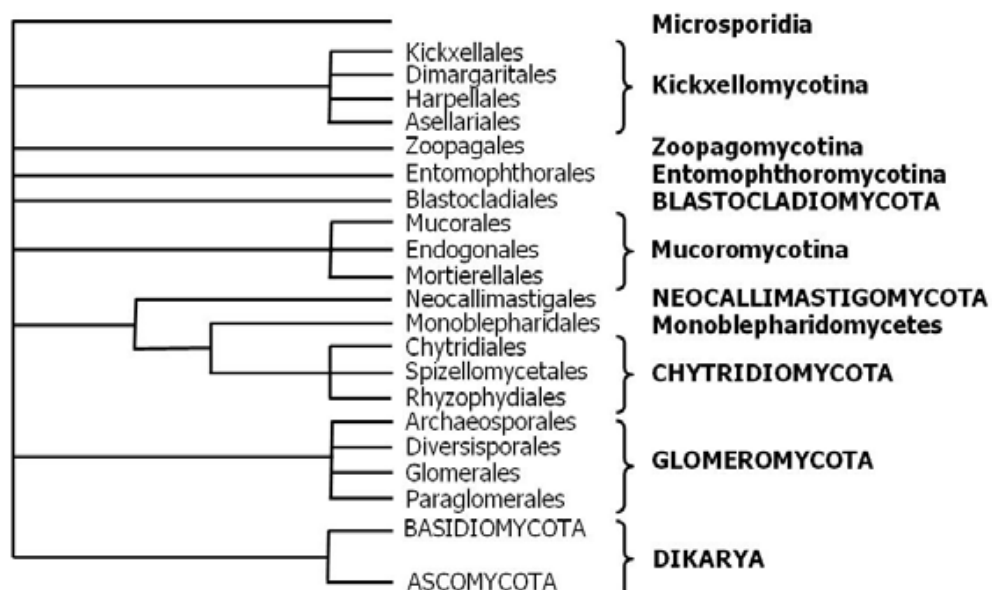


Fig. 4 Schema del Quinto Regno elaborato da Hibbett e Binder (2007) (Elementi chimici nei funghi superiori 2007).

Pur essendo le analisi molecolari e genetiche uno strumento preziosissimo per il riconoscimento delle specie, tuttavia le tecniche tradizionali basate sulla morfologia sono ancora oggi efficaci e utili, anche perché avendo comunque dei costi, tali tecniche possono incidere facilmente sul bilancio di un laboratorio. Il riconoscimento dei caratteri macroscopici e microscopici della fisiologia, possono permettere per molti generi e specie un riconoscimento certo e rapido, permettendo al ricercatore di utilizzare le tecniche molecolari e genetiche solo per quei casi fortemente dubbi o di mancato riconoscimento/possibile nuova specie.

Il riconoscimento, quando si scende a livello di generi e specie è spesso molto complicato in quanto di uno stesso fungo esistono forme differenti a seconda della riproduzione, se sessuata o asessuata e perfino le condizioni ambientali in cui si sviluppa possono determinare differenze tali da rendere le tecniche di riconoscimento macroscopiche poco affidabili. In nomenclatura si parla di olomorfo per intendere “L’intero Fungo” cioè quei funghi di cui è nota sia la forma sessuata, che quella asessuata. Ad Esempio *Trichoderma* (forma asessuata) e *Hypocrea* (forma sessuata). La forma sessuata è indicata con il termine teleomorfo, mentre la forma asessuata si definisce anamorfo. Nel caso in cui una delle due forme non è conosciuta si può definire come olomorfo anche soltanto la forma nota, che sia quella sessuata o asessuata. Non è raro neanche il caso che per un stesso olomorfo si conoscano più forme anamorfiche.

Dal punto di vista morfologico il fungo non è solo il ben noto corpo fruttifero commestibile o no, che siamo da sempre abituati a vedere. I funghi infatti sono anche i lieviti, o le muffe che a volte vediamo nelle pareti delle case o delle grotte. Sono funghi anche i licheni che incrostano alberi e rocce. Sono organismi eucarioti, con cellule quindi dotate di nucleo con membrana e mitocondri. Sono organismi pluricellulari filamentosi con cellule che possono allungarsi indeterminatamente, mentre il diametro varia

da 2 a 30  $\mu\text{m}$ . L'insieme di queste cellule viene detto micelio. Può essere incolore al microscopio o fortemente melanitizzato e quindi contribuire al riconoscimento del fungo, dato che i funghi con melanina sono relativamente meno numerosi di quelli con poca o assenza di melanina.

Le ife fungine si accrescono in una fascia d che va da 30 a 400 micrometri. Le pareti cellulari al di sotto di questa fascia si irrigidiscono molto rapidamente. Il protoplasma migra costantemente dalla parte più vecchia dell'ifa alle zone più prossime all'apice e più giovani. Per conseguenza nelle colonie il nucleo è la parte più vecchia e probabilmente non più attiva. Nella maggior parte dei funghi le ife presentano dei setti che possono anche essere usati per scopi diagnostici distinguendo tra funghi settati e non settati. Bisogna però tenere conto che i setti presentano sempre delle aperture da cui nuclei e protoplasma possono passare e non formano quindi dei veri e propri comparti separati, ma piuttosto dei comparti interconnessi. Le stesse ife possono collegarsi e fondersi tra loro per migliorare lo scambio dei nutrienti e del materiale genetico, migliorando così le possibilità di superare le difficoltà e gli stress. La germinazione asessuata che spesso è la più frequente avviene per semplice mitosi, con formazione di spore che se trovano il substrato adatto possono germinare o restare in sonno fino a quando non si verificano condizioni favorevoli alla germinazione. Quella sessuale invece avviene attraverso l'unione di due cellule aploidi che così danno vita a una cellula diploide. In seguito attraverso fenomeni di mitosi si formano le spore che così iniziano un altro ciclo vitale del fungo.

Sono chemio eterotrofi, cioè non sono in grado di produrre da soli gli zuccheri di cui necessitano per svolgere i loro processi vitali. Tuttavia, una volta ottenuto il glucosio sono in grado di estrarre acqua ed altri elementi chimici da sostanze anche complesse o dai reticoli cristallini dei minerali stessi. Alcuni ricercatori hanno dimostrato la capacità di alcuni funghi di

estrarre ferro e magnesio dai minerali dell'asbesto modificandone il reticolo cristallino. Interessante è il metabolismo dei lieviti, che a differenza di altri funghi sono in grado di vivere in condizioni aerobiche o anaerobiche respirando l'ossigeno o attivando processi di fermentazione, molto sfruttati nell'industria alimentare.

I funghi sono essenziali nell'ecosistema sia per i rapporti che instaurano con piante ed animali, sia perché agevolano i processi di alterazione delle rocce (Weathering). Producono enzimi in grado di agire su composti chimici come lignina e cellulosa, sostanze molto complesse formati da idrocarburi aromatici il cui legame ad anello è molto difficile da smontare, ma che loro sono in grado di rompere, sfruttando tre enzimi in un azione sinergica in cui l'uso degli enzimi viene regolato con un meccanismo a feedback. Gli enzimi usati sono endoglucanasi, esoglucanasi e cellobiasi. Ognuno di essi agisce su una parte specifica delle molecole di lignina e cellulosa trasformandole in molecole più semplici e utilizzabili dal fungo.

Azioni simili sono in grado di svolgere su nitrati, nitriti, e minerali del fosforo come l'apatite. Nel corso del tempo le loro attività li hanno portati sempre più ad interagire con le piante con le quali instaurano rapporti che vanno dal parassitismo alla simbiosi, in cui entrambi gli organismi ricavano un reciproco vantaggio. Secondo recenti studi le specie di funghi simbiotici sarebbero più di 6000, mentre le piante che presentano rapporti di simbiosi sarebbero il 98% delle specie conosciute. Questi valori potrebbero però continuare a crescere, anche perché sono ancora molte le specie fungine virtualmente sconosciute. Sono simbiotici molti dei funghi eduli e spesso l'associazione simbiotica non può essere riprodotta o indotta dall'uomo. La simbiosi è un fenomeno complesso che coinvolge vari aspetti della vita dei due organismi.

Attraverso la simbiosi la pianta riceve elementi chimici essenziali come azoto fosforo e potassio, ma anche altri altrettanto essenziali e acqua in più

che il fungo con le sue ife è in grado di estrarre dai reticoli dei minerali o dai pori che le radici della pianta in virtù del loro diametro, non sono in grado di esplorare, e che invece, sono accessibili alle ife del fungo. Cede in cambio zuccheri e lipidi, che il fungo non è in grado di sintetizzare ottenendo anche protezione dai parassiti da parte di esso.

La rete di ife di un singolo fungo può coprire aree enormi, inoltre non si conosce ad oggi la durata della vita di molti funghi. Nel 1992 alcuni ricercatori hanno dimostrato che un singolo individuo aveva colonizzato con le sue ife un intero ettaro di foresta. (Smith et al., 1992).

Una stessa pianta può presentare anche più simbionti. Inoltre gli stessi funghi spesso formano comunità fondendo le loro ife e creando così una rete attraverso cui passano acqua nutrienti, ma anche informazioni attraverso segnali biochimici, sullo stato di salute o la presenza di parassiti o segnali trasmessi da piante attaccate da patogeni che attraverso la rete di ife informano le piante ancora sane in modo che possano preparare le difese. Questo complesso sistema di interazioni, viene comunemente definito Wood Wide Web, in quanto rilevato per la prima volta tra le piante dei boschi (1994, Modiola et alii) In seguito è stato riscontrato anche in parecchie coltivazioni. Nei fatti i funghi simbionti svolgono la funzione di un vero e proprio apparato radicale ausiliario. Il sistema permette alle piante anche di convogliare sostanze nutritive alle piante più giovani collegate tramite le ife, permettendo loro di superare i periodi di crisi o migliorando e agevolandone lo sviluppo.



### **3.2 Capacità di assorbimento di metalli pesanti ad opera dei funghi**

La grande capacità dei funghi di esplorare enormi volumi di suolo, la possibilità delle ife di insinuarsi in spazi tra le particelle argillose e di sostanza organica, unita all'azione degli enzimi da loro prodotti, permette loro di interagire su una grandissima quantità di sostanze chimiche e minerali, sia naturali che artificiali, rendendoli così organismi fondamentali nella gestione degli equilibri di qualunque suolo.

Nonostante il grande interesse che suscitano, sia come organismi indicatori della qualità dei suoli, sia come specie sentinella, o come specie pioniere nella colonizzazione dei substrati, la grande maggioranza dei meccanismi di interazione tra funghi e metalli non è stata ancora chiarita. A complicare la situazione si aggiungono sia la grande variabilità dei funghi a livello di genere e ancora di più al livello di specie, che rende complicato lo studio dei meccanismi di interazione per ognuno di loro, sia il loro comportamento. Quasi tutte le specie di funghi infatti interagiscono con alcuni elementi, ma non con tutti. A volte interagiscono con un metallo ma non con i vicarianti di quel metallo. In molti casi il meccanismo coinvolto è diverso e comporta o l'assorbimento dell'elemento o la sua neutralizzazione tramite chelanti o enzimi, spesso allo scopo di impedirne l'utilizzo da parte degli antagonisti più che per assorbimento diretto. Gli utilizzi dei metalli pesanti e l'interazione con essi, varia da specie a specie, e anche nell'ambito dello stesso genere si possono avere differenze da una specie all'altra.

L'interazione può essere di vari tipi, ma nella fase iniziale, i principali meccanismi sono tre. La chelazione, il bio accumulo, e il bio assorbimento. Ognuno dei tre presenta meccanismi e caratteri differenti e ognuno di questi viene applicato ad uno o ad alcuni elementi, ma non a tutti. Specie

che accumulano piombo, possono invece usare la chelazione con il ferro in quanto non lo utilizzano, o è dannoso per il loro organismo, ma per loro è altrettanto importante renderlo inutilizzabile ad eventuali antagonisti. Attraverso l'utilizzo di molecole capaci di produrre con il metallo un legame particolarmente resistente e quindi non scindibile da un altro fungo, in quanto quest'ultimo non è in grado di produrre gli enzimi necessari, possono o utilizzare soltanto loro quell'elemento chimico creando così delle scorte di esso, oppure semplicemente per impedirne l'utilizzo a quei funghi che ne hanno assoluta necessità per il proprio organismo, impedendo così che possano accrescersi e competere per spazio e risorse.

I meccanismi di bio accumulo e bio assorbimento, invece sono ancora poco chiari nelle loro dinamiche e spesso sono diversi da specie a specie e anche a seconda degli elementi chimici coinvolti.

La Biosorption e la Bioaccumulation sono gestiti da meccanismi diversi. In particolare la biosorption sembra non dipendere dal metabolismo del fungo ed avvenire in maniera del tutto indipendente, in quanto riscontrata anche in biomasse di microrganismi morti (Arica et alii, 2004). I meccanismi coinvolti sono tutti meccanici o fisici e sono le interazioni elettrostatiche, legami covalenti, complessazione, scambio ionico, Forze di Wan Der Waals, assorbimento e precipitazione, scambio ionico.

La bioaccumulation invece è un processo che si svolge come attività dell'organismo, che attraverso le sue attività e il suo metabolismo favorisce l'assorbimento di un elemento. Nella fase iniziale avviene tramite interazione tra gli ioni metallici positivi e la carica negativa della parete cellulare del fungo. Solo in seguito il metallo penetra all'interno della cellula e viene accumulato al suo interno. Molti gruppi ionici sono coinvolti nelle operazioni di cattura e assorbimento dei metalli, i gruppi carbossilici, fosfatici, le ammine e i sulfidrilici, sono tra i più comuni, grazie alle loro cariche ioniche e alla loro alta capacità di interazione con cationi

differenti. Una volta all'interno delle cellule, il metallo può essere usato dal fungo nello svolgimento delle sue funzioni vitali. I meccanismi di utilizzo possono essere variabilissimi e dipendono dal metallo, ma anche dal fungo e dall'ambiente in cui esso si trova.

Le ragioni per cui i funghi assorbono e accumulano i metalli nelle pareti cellulari o all'interno delle cellule non sono ancora del tutto chiari. Un'ipotesi possibile è che l'assorbimento dei metalli all'interno delle pareti cellulari possa irrobustire la parete cellulare, rendendola più resistente a stress meccanici o agli attacchi di altri organismi.

Motivazione analoga potrebbe avere l'accumulo di metalli all'interno delle cellule stesse. Tuttavia è ben noto come alcuni di questi metalli vengano utilizzati nella produzione di enzimi o di altre sostanze allo scopo di estrarre altri elementi essenziali, o come leganti, o per usarli come armi contro altri organismi particolarmente sensibili a questi elementi. Particolarmente interessante appare la capacità di assorbimento di alcune specie di funghi in presenza di alcuni metalli, ma anche si ha come conseguenza la maggiore o minore crescita del fungo o la mancanza di carpofori in presenza dell'elemento in esame. Queste caratteristiche hanno anche permesso di individuare alcune specie fungine utili come bioindicatori della qualità dei suoli in funzione della loro presenza o assenza (elementi chimici nei funghi superiori, 2007).

Il meccanismo della chelazione, usato dai funghi, permette loro di bloccare elementi metallici per vari scopi, incluso quello di rendere il suolo abitabile. Il meccanismo è semplicissimo e si basa sul fatto che un elemento metallico può comportarsi come un acido di Lewis, e per conseguenza formare legami molto stabili con molecole che lo trattengono con un meccanismo legante simile come struttura alla chela di un granchio. Da qui il nome.

Per effetto della chelazione, spesso l'elemento perde la sua tossicità, che spesso è determinata dallo stato di ossidazione. La stabilità della molecola così ottenuta è determinata dall'aumento di entropia.

Tra i chelanti i più comuni sono la EDTA, i carbonati, le poliammine, gli ossalati, il glicinato.

I funghi utilizzano molto facilmente gli ossalati, per via della loro elevata insolubilità, particolarmente quella dell'ossalato di calcio, ad esempio, noto anche per formare i calcoli renali. Nei licheni, l'ossalato riveste il tallo conferendogli una notevole resistenza e permettendo la sopravvivenza del fungo e dell'alga anche in condizioni ambientali estreme. I chelanti agiscono anche nel processo di dissoluzione dei minerali, contribuendo ad aggredirli chimicamente. Interessante è notare ad esempio come i licheni aggrediscano più facilmente i graniti rispetto ai calcari (Del Monte 1996) . Lo stesso autore, ha anche notato come il minerale che si altera più facilmente sia la mica nera (biotite), mentre il più difficile è il K feldspato (ortoclasio). Il quarzo viene del tutto ignorato.

La cosa non stupisce, in quanto il quarzo è composto quasi unicamente da silicio e ossigeno con una struttura cristallina estremamente difficile da rompere. Mancano quasi del tutto altri elementi chimici nel cristallo e spesso quei pochi che ci sono o non sono importanti dal punto di vista nutrizionale o sono più facilmente estraibili da altri reticoli cristallini.

### **3.3 Simbiosi Funghi Piante: Una preziosa risorsa**

La simbiosi funghi piante è una delle forme di associazione mutualistica più antica al mondo. Attualmente oltre il 90% delle specie vegetali esistenti presenta simbiosi con funghi, spesso una stessa pianta può presentare più di un fungo simbiote e la loro riproduzione o affermazione dipende dalla presenza dei funghi simbiotici.

Attualmente si ritiene che vi siano circa  $10^7$  specie di funghi simbiotici nella rizosfera di una pianta, se ad essi aggiungiamo anche i batteri e gli altri organismi che normalmente vivono in essa, abbiamo il quadro di una comunità estremamente complessa in cui perfino gli organismi patogeni svolgono un ruolo importante nel mantenimento degli equilibri naturali.

I funghi simbiotici si dividono principalmente in ectomicorrizici ed endomicorrizici. I primi si limitano a rivestire le radici con un avvolgimento di ife noto come reticolo di Hartig, posto sull'apice della radice, senza penetrare all'interno delle cellule e fermandosi al rivestimento epidermico della radice.

Sono importanti per le essenze forestali, mentre non si trovano nelle piante agrarie. Le specie conosciute sono circa 5000, ma in realtà sono quasi sicuramente molte di più, tenendo conto della grande variabilità che i funghi presentano.

I funghi endomicorrizici dal canto loro, sono dei simbiotici obbligati. Se ne conoscono 150 specie e colonizzano circa il 95% delle piante agrarie.

Senza la loro presenza la crescita e lo sviluppo delle piante agrarie subirebbe una drastica diminuzione di crescita e sviluppo con conseguente perdita di produzione, le piante sarebbero molto più esposte agli attacchi di patogeni e parassiti.

Se si tiene conto che la presenza di funghi simbiotici è in grado di aumentare la crescita di una pianta del 20% e più, è molto facile rendersi

conto di quanto la perdita della simbiosi potrebbe influire sulla produzione agraria.

Le uniche colture che sembrano non presentare simbiosi infatti sembrano essere le Crucifere e le Chenopodiaceae, mentre tutte le colture estensive hanno simbionti e lo stesso vale per le essenze forestali e per gli alberi da frutto.

Le endomicorrize si dividono in cinque sottogruppi, di cui il più importante è quello delle micorrizze vescicolo arbuscolari, dette anche VAM. Queste ultime penetrano all'interno delle cellule della radice, formando all'interno delle strutture dette arbuscoli.

Attraverso gli arbuscoli avvengono gli scambi tra il fungo e le piante. Il fungo passa alle piante gli elementi essenziali per la pianta, in cambio attraverso di essi il fungo riceve dalla stessa gli zuccheri che non è in grado di sintetizzare da solo. La simbiosi tra i due organismi è talmente stretta che il fungo può riprodursi solo in presenza dell'ospite, e non è in grado di vivere autonomamente come invece altri funghi, come i saprotrofi, sono in grado di fare.

Oltre agli scambi nutritizi, il fungo simbionte è in grado di svolgere altre funzioni. Con le sue ife è in grado di estendere di sette volte la capacità di esplorazione del terreno da parte delle radici. Le ife, di dimensioni minori, sono in grado di esplorare volumi maggiori e interstizi negati normalmente alle radici. Inoltre sono in grado di aggredire i reticoli cristallini dei minerali, estraendo gli elementi nutritivi direttamente da essi. Inoltre con opportune sostanze chimiche sono in grado di stimolare la crescita di altri organismi utili alla pianta, creando le condizioni favorevoli per la crescita degli azoto fissatori, dei PGPR, (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), ma anche degli antagonisti di organismi ostili alla pianta.

Tutto questo determina un miglioramento delle condizioni ambientali e biologiche nelle aree del suolo più prossime alle radici, ma anche in aree

più lontane, dato che i funghi esplorano ampi volumi di terreno e tendono a creare involuppi di ife che si estendono fino a coprire volumi di suolo che possono essere dell'ordine delle centinaia di metri cubi.

### **3.4 Funghi simbiotici opportunisti**

La simbiosi è un meccanismo diffuso in natura non solo alla scala dei microrganismi ma anche tra gli animali superiori. Tipici esempi sono il paguro e l'attinia o il pesce pilota e gli squali.

Gli scopi della simbiosi sono molteplici. Alcune specie sfruttano questo meccanismo di interazione a scopo di protezione reciproca, altri per una migliore possibilità di reperire nutrienti, in altri casi per scopi riproduttivi, ad esempio le piante con gli insetti. La simbiosi è diffusa in natura più di quanto si pensi, con meccanismi complessi e ancora oggi non del tutto compresi e che specialmente tra i microrganismi possono comprendere anche più di due organismi.

Recentemente si è scoperto che i funghi simbiotici oltre a bloccare ed eliminare le specie parassite della pianta ospite, sono in grado di stimolare e privilegiare la crescita delle comunità microbiche positive per la pianta, come i batteri azoto fissatori o altri che pur non interagendo con il fungo o con la pianta, impediscono l'insediamento di comunità microbiche ostili.

Il rapporto che si instaura tra i due organismi è, come detto, complesso e non sempre facile da definire. A volte può sfociare nel parassitismo a sfavore di uno dei due organismi, specie se uno dei due si trova in condizioni di stress e mette a rischio la sopravvivenza dell'altro. Più spesso tuttavia il vantaggio è reciproco, e la mancanza del simbionte può anche impedire alcune funzioni vitali.

Attualmente il 95% delle specie vegetali presenta fenomeni di simbiosi con funghi, che a loro volta per vivere necessitano della simbiosi con una pianta. Alcune specie sono caratteristiche solo di una o di alcune specie vegetali, oppure sono tipiche solo delle essenze forestali, altre invece sono in grado di legarsi a quasi tutte le specie vegetali. E sempre più spesso ci si accorge che in una stessa pianta i funghi simbiotici sono sempre più di uno.



Oltre ai funghi micorrizici che sono simbiotici obbligati, tuttavia esistono dei funghi che intrattengono rapporti non di simbiosi obbligata con le piante. Questi funghi, solitamente saprotrofi, sono in grado di vivere anche senza la simbiosi con le piante, degradando la sostanza organica presente nella lettiera. Tuttavia se le condizioni lo richiedono o per ragioni di opportunismo formano rapporti di simbiosi con le piante.

Alcuni autori ritengono che questo comportamento del fungo sia un retaggio primitivo, dell'epoca in cui ancora il meccanismo della simbiosi tra funghi e piante era ancora agli inizi e non aveva raggiunto il livello di specializzazione di oggi. I funghi con queste caratteristiche sono attualmente una minoranza, tuttavia sono molto importanti per la loro versatilità e per la loro capacità di produrre enzimi e sostanze chimiche che risultano un efficace arsenale contro i patogeni.

Il vantaggio principale per gli uomini è la maggiore facilità di inoculo e gestione rispetto alle micorrize, ma anche la capacità di vivere ed agire in contesti in cui i funghi micorrizici non sono in grado di operare. Attualmente è allo studio la possibilità di sfruttare questi funghi in ambiente subaereo per proteggere foglie e fusti delle piante dagli attacchi di patogeni come *Bothrys cinerea*.

I funghi del genere *Trichoderma*, sono già dagli anni settanta conosciuti per la loro capacità di condurre esistenze autonome o in simbiosi con le piante, al punto da essere definiti saprofita e simbionte opportunisti, proprio per evidenziare la sua versatilità. La grande resistenza ed adattabilità, la capacità di crescere in ambienti potenzialmente ostili, la possibilità di sfruttare le spore per indurre la colonizzazione facilmente e a basso costo, lo hanno reso sempre più importante, specie in regime di agricoltura biologica, dove la sua capacità di operare contro funghi patogeni pericolosi come ad esempio *Rhizoctonia solani*, lo ha reso quasi indispensabile.

Anche alcuni ceppi non patogeni di *Fusarium oxysporum*, hanno presentato caratteristiche interessanti per quanto riguarda la lotta biologica e in bioremediation sui metalli pesanti, tuttavia permane qualche dubbio sul loro utilizzo, in quanto non si è certi che la patogenicità sia del tutto scomparsa e al genere appartengono funghi ad elevato livello di patogenicità e spesso non controllabili neanche con i fungicidi industriali.

L'azione colonizzatrice di *Trichoderma* non si spinge in profondità. Rispetto ai funghi simbiotici veri e propri, che spesso colonizzano la radice fino a spingersi all'interno delle cellule stesse, si ferma alla parte corticale, senza penetrare nelle cellule. Tuttavia colonizza la superficie e la parte corticale così efficacemente da impedire a qualunque parassita di potervi accedere. Con l'uso di sostanze antibiotiche è in grado di interdire la rizosfera anche a batteri ed altri organismi, ma grazie allo studio delle interazioni molecolari non impedisce la colonizzazione da parte di batteri azoto fissatori o comunque utili alla pianta, estendendo così il suo controllo all'intera comunità microbica.

Tuttavia la sua azione colonizzatrice poco pronunciata fa anche pensare che la sua attività di simbionte sia un'evoluzione recente o il risultato di un adattamento di convenienza più che una vera e propria scelta. Interessante è notare come i meccanismi biochimici dell'interazione tra pianta e fungo siano molto simili a quelli che si hanno tra la pianta e un parassita. La pianta reagisce come di fronte a una aggressione e gli enzimi attivati da *trichoderma* sono gli stessi che usano i parassiti nelle fasi iniziali di aggressione. Tuttavia, rispetto ai patogeni sembra che i due organismi in qualche modo si riconoscano, limitando questa lotta solo alla fase iniziale del contatto.

Secondo alcuni autori questa sarebbe la conferma che la simbiosi tra *trichoderma* e le piante sia un'evoluzione recente, o secondo altri una testimonianza delle prime interazioni tra funghi e piante.

Nel rapporto di simbiosi e protezione giocano un ruolo importante gli enzimi chitinasi e cellulasi, che il fungo usa per forare lo strato corticale e accedere creando il collegamento con la radice. Lo stesso enzima che usa per attaccare i patogeni e a volte cibarsene. Come ogni simbiote il fungo estrae acqua ed elementi dal terreno e dalle soluzioni circolanti e li fornisce alla pianta ricevendo da essa quelle sostanze nutritive che non è in grado di produrre.

Negli ultimi anni ha suscitato un certo interesse la capacità del fungo *Trichoderma* di legare con sostanze chelanti ferro e altri elementi chimici metallici. Quando questi elementi non vengono bloccati con essudati alle particelle del suolo (argilla e sostanza organica), vengono assorbite direttamente dal fungo che li assorbe e mantiene all'interno dello strato dermale dell'ifa. Non è chiaro perché il fungo lo faccia. Il processo è sia meccanico chimico che attivato dal fungo stesso.

La capacità dimostrata da *Trichoderma* nel legarsi e colonizzare la superficie della radice ha tuttavia messo in evidenza come esso possa fungere da barriera per molti degli elementi tossici presenti nel suolo, particolarmente per quanto riguarda i metalli pesanti, con i quali mostra una buona capacità di interazione.

## **Capitolo 4**

### **Genus *Trichoderma***

## 4.1 *Trichoderma*

Al genere *Trichoderma* appartengono molte specie di funghi saprotrofi, accomunati da alcune caratteristiche sia morfologiche che comportamentali. Al 2011 le specie finora censite risultavano 104, tuttavia anche grazie al progredire delle ricerche genetiche, non vi è dubbio che il numero potrebbe facilmente aumentare (fonte [www.isth.info.in](http://www.isth.info.in)). Questa grande variabilità specifica, presente in molti funghi del suolo, è la diretta conseguenza dell'enorme capacità che hanno i suoli di modificare le proprie caratteristiche anche in pochi metri. Gli organismi che vi vivono o vi si insediano tendono ad adattarsi alle nuove condizioni e per conseguenza spesso si modificano fino a evolvere in una specie differente. Ciò è particolarmente vero per organismi come funghi e batteri, che sono organismi molto semplici e che si riproducono molto rapidamente.

*Trichoderma* è l'anamorfo del genere *Hypocrea* un fungo ascomiceta che viene raramente rinvenuto in natura. Al contrario il genere *Trichoderma* è facilmente rinvenibile un po' in tutto il mondo e in tutte le condizioni ambientali, anche se predilige climi temperati.

Sono funghi saprofiti con micelio abbondante formato da ife ramificate e che presentano cellule polinucleate. Il colore delle colonie varia da biancastro fino a giallino e verde intenso, che è il colore più frequente e che appunto lo fa chiamare fungo verde (Green Mold). Produce moltissime spore e la crescita è molto rapida e la sua coltivazione è molto semplice.

Produce una grande quantità di enzimi polimerizzanti, che gli consentono di estrarre carbonio e azoto da una grande quantità di sostanze. I suoi enzimi sono in grado di attaccare il legame ad anello degli idrocarburi aromatici, cosa che gli permette di degradare facilmente lignina e cellulosa. La sua fonte di azoto preferita è l'azoto ammoniacale, ma è in grado di assorbire anche l'azoto dei nitrati. Colonizza facilmente tessuti morti e resti

organici, e agisce da antagonista su molti altri funghi del suolo, arrivando anche ad attività di vera e propria predazione nei confronti di essi. Le azioni che svolge nei confronti di altri microrganismi sono controllate da enzimi, e antibiotici o tramite sostanze chelanti, capaci di impedire l'accesso a sostanze nutritive agli antagonisti. Pur essendo un saprofitta, *Trichoderma* instaura rapporti di simbiosi opportunistica con le piante, stimolandone la crescita e proteggendole dai parassiti. Questa qualità, in particolare l'antagonismo di *Trichoderma* sui patogeni fu scoperto già nel 1934 (Weindling). In seguito nel 1983 sono state scoperte le sue capacità come micoparassita, la sua capacità di distruggere le ife di altri funghi, l'uso di antibiotici e di altri meccanismi per sottrarre spazio vitale ad altri funghi (Cook and Baker 1983).

Un esempio interessante di azione sui funghi patogeni è la sua capacità di degradare l'enzima pectinasi, essenziale per il fungo patogeno *Botrytis cinerea*, la sua azione antagonistica arriva anche a spingerlo ad attaccare il fungo patogeno, usandolo poi come fonte di nutrimento, ad esempio è ben documentata l'attività di predazione nei confronti di *Rhizoctonia solani*.

*Trichoderma* determina molti vantaggi per le piante, soprattutto il controllo biologico sui parassiti delle piante e la capacità di assorbire nutrienti più efficacemente, alla stregua di un vero e proprio fungo micorizzico. Anche i Nematodi subiscono infatti la sua azione. Agisce anche sui batteri, stimolando quelli positivi per la pianta, mentre scoraggia e allontana quelli dannosi (Harman et al. 2004).

Inoltre viene utilizzato anche nell'industria, abitualmente per la produzione di diversi enzimi idrolitici, ma anche antibiotici e altri prodotti chimici. Viene anche utilizzato per decolorare i jeans al posto di solventi chimici inquinanti (Lea Heikinemo 2002, Donald Lester 2010) . Recentemente sono al vaglio le sue capacità di assorbimento e degradazione di parecchi inquinanti e metalli pesanti. Nel 2004 è stata dimostrata la sua efficacia

contro gli inquinamenti di idrocarburi (Harman et al.). Sempre nel 2004 Vinale et al. hanno dimostrato che alcuni ceppi di *Trichoderma* hanno la capacità di sopportare alti livelli di rame.

Oltre ai vantaggi vi sono tuttavia anche svantaggi, magari meno evidenti, ma che possono anche essere importanti da considerare quando se ne propone l'uso.

Tra gli svantaggi c'è sicuramente l'antagonismo particolarmente sviluppato che il genere presenta nei confronti di altri funghi. *Trichoderma* è in grado di provocare perdite di oltre il 50% se contamina un allevamento di funghi. Inoltre la grande produzione di spore, caratteristiche del genere, lo rendono un contaminante molto diffuso, all'altezza di generi come *Aspergillus* o *Penicillium*, nei confronti dei quali spesso mette in atto con successo azioni di antagonismo e interdizione dei nutrienti.

In ambiente medico è considerato un contaminante pericoloso, con il rischio per i donatori di organi. Sarebbe infatti in grado di colonizzare gli organi umani, prima del loro trapianto.

La sua azione antibiotica infine crea qualche dubbio sul suo utilizzo in agricoltura. Ci si chiede infatti se sia in grado di trasmettere antibiotici alla pianta e particolarmente nei tuberi, con conseguente rischio di assorbimento ed effetti dannosi nei confronti dell'uomo. Attualmente però non si sono avuti riscontri. In Germania viene utilizzato regolarmente in agricoltura biologica, e considerato un'alternativa più efficace dei prodotti chimici.

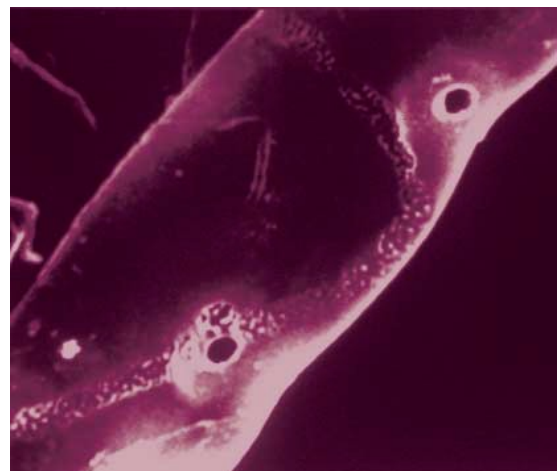


Fig. 5 Fori provocati da *Trichoderma* su ife di *Rhizoctonia solani*. (A. P.S. 1983)

## 4.2 *Trichoderma harzianum*

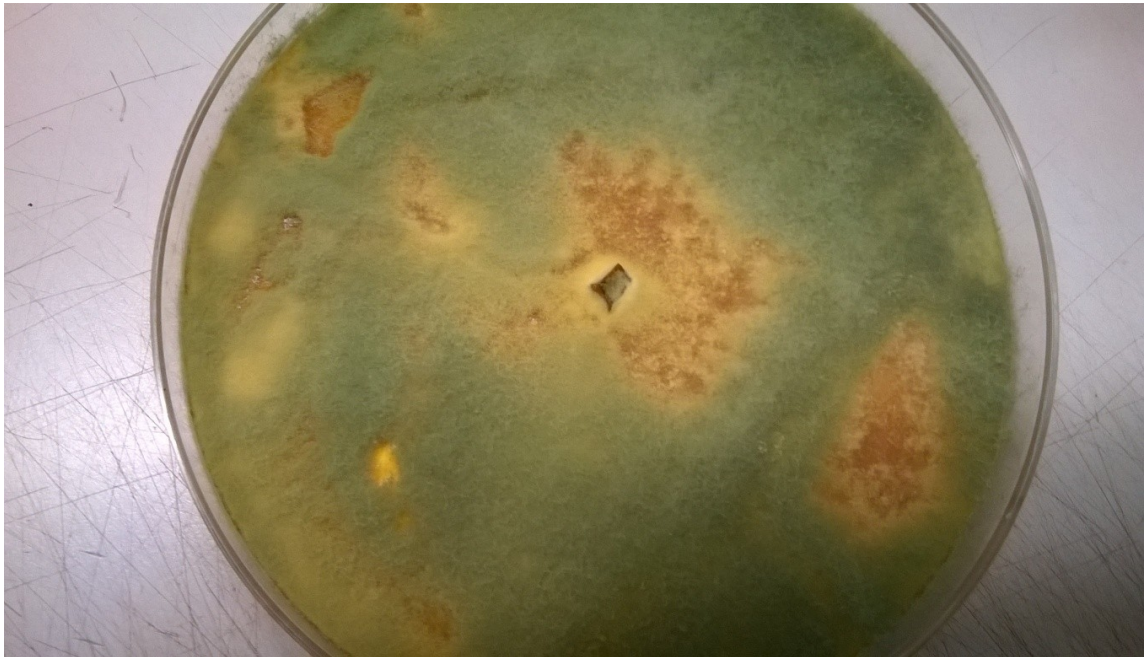


Fig. 6 Ceppo di *Trichoderma harzianum* CECT 2413 utilizzato. (Di Bella V.)

*Trichoderma harzianum* è una delle specie più note di *Trichoderma*. Come gli altri presenta una crescita rapida che in circa sette giorni gli permette di colonizzare una piastra di Petri standard Ø 10 cm.

La colonia presenta abbondante micelio, simile a un feltro, di colore verde oliva a maturazione, bianco avorio nella fase iniziale di crescita. Produce moltissime spore come tutti i funghi del suo genere, di piccole dimensioni e rotonde. La coltivazione è molto facile e si adatta a quasi tutte le condizioni ambientali.

Come gli altri ceppi è un saprofito che ha una buona attitudine ad applicare meccanismi di simbiosi con le piante e ad attivare meccanismi antagonisti su funghi patogeni (J. Montealegre et al., 2009, Biljana Gveroska e Jugoslav Zuberovsky 2012).

Oltre al ruolo di antagonista la sua grande capacità di produzione di enzimi gli permette di degradare facilmente sostanze organiche complesse come



lignina, cellulosa e anche polimeri plastici artificiali (H. W. Sowmya et al. 2014). Questa caratteristica lo ha reso interessante sia per l'industria che ne sfrutta gli enzimi sintetizzati da esso, sia in chiave di risanamento ambientale nella degradazione di rifiuti industriali e nella bonifica di siti inquinati.

*Trichoderma harzianum* ha dimostrato una notevole efficacia nell'assorbire cromo, nel degradare il polietilene e anche una notevole resistenza a molti degli antiparassitari comunemente usati. Assorbe anche il ferro che spesso blocca con i cheloni per renderlo indisponibile ad altri microrganismi, e anche il rame che viene trovato in prevalenza nella parete delle ife, in cui si accumula. Una possibile ipotesi di questo fenomeno è la ben nota tossicità del rame nei confronti di molti microrganismi. Il fungo potrebbe sfruttarlo come mezzo di difesa, specie nei confronti dei batteri. Il meccanismo di assorbimento non è ancora del tutto chiarito, ma sembra un mix tra l'assorbimento involontario dovuto all'affinità elettronica tra le molecole che costituiscono la parete delle ife e il rame, e un assorbimento selettivo da parte del fungo, che sceglie di accumulare l'elemento.

Recentemente si sta valutando il suo utilizzo anche nella depurazione di reflui di varia natura.

### 4.3 Interazione *Trichoderma* e piante, simbiote e opportuniste

Il genere ha da sempre presentato una grande capacità di interazione con le piante. Stranamente, tuttavia non si comporta come un simbiote o come un fungo micorrizico. In essi il rapporto è infatti molto più stretto e senza la pianta simbiote il fungo non può vivere. *Trichoderma* è invece in grado di vivere anche in autonomia dalle piante e la sua interazione con essa sembra in effetti più blanda a cominciare dal meccanismo di interazione. A differenza di molti simbioti abituali che tendono a penetrare all'interno della radice e delle cellule, *Trichoderma* si mantiene all'esterno, limitandosi alla sola area corticale delle radici, formando attorno ad essa una sorta di manicotto di ife, che gli permette di controllare l'accesso alle radici, mentre gli scambi di sostanze nutritive avvengono attraverso la superficie corticale.

Una ulteriore stranezza di questo meccanismo è l'uso di enzimi chitinolitici per penetrare lo strato corticale, con un meccanismo analogo a quello dei funghi patogeni e per conseguenza la reazione iniziale della pianta, che attiva gli stessi meccanismi biochimici che attiverebbe in presenza di un patogeno.

Il fungo d'altra parte non spinge la sua azione di penetrazione al di là delle cellule corticali. Nel 1999 Yedidia et al. ipotizzarono che la produzione di callosio da parte della pianta blocca la colonizzazione delle radici. Solo successivamente si ha il riconoscimento pianta ospite e questo comportamento porta a ipotizzare che o il meccanismo di simbiosi sia relativamente recente, o che possa all'opposto, essere molto più primitivo e nei fatti la testimonianza del primo rapporto tra funghi e piante.

Oltre al rapporto di simbiosi che instaura, *Trichoderma* è in grado di indurre resistenza a stress e resistenza indotta e sistemica ai patogeni delle

piante. Quest'effetto potrebbe essere ancora più importante dell'azione antagonistica del fungo sui patogeni visto che permette alla pianta di attivare i suoi meccanismi difensivi in anticipo sul patogeno (Harman et al. 2004).

Questa risposta attiva della pianta al riconoscimento del patogeno infatti, determina modifiche nel metabolismo della pianta che può così diventare incompatibile per il patogeno e con conseguente sviluppo di resistenza da parte della pianta che può evitare il contagio o ridurlo al minimo.

Queste resistenze portano la pianta a formare suberificazioni, gomme, compartimentazioni, ma anche a stimolare la produzione di sostanze chimiche nocive o repellenti per il parassita.

Gli studi sulla resistenza indotta da *Trichoderma* sono cominciati con la fine degli anni 90 e da quel momento in poi sono stati condotti su vari ceppi di *Trichoderma*.

Oltre ai funghi, il genere è in grado di indurre resistenza anche a virus e batteri nocivi e questa capacità si trasmette anche al fogliame e alle parti subaeree, nonostante il fungo sia tellurico. (De Mayer et al. 1998). Le sperimentazioni in questo campo sono ancora in corso e con molta strada da percorrere.

La resistenza indotta porta la pianta a produrre fitotossine che ostacolano o impediscono la crescita dei patogeni, oltre a un riconoscimento più immediato del parassita che quindi non riesce a svolgere le proprie funzioni efficacemente fin dal primo momento, riducendo così enormemente le possibilità di infezione.

L'interazione tra il fungo e la pianta comporta vari benefici tra cui: l'incremento di bionutrienti importanti per la rizosfera, produzione di fitormoni, inattivazione di composti tossici presenti nel suolo, che non interferiscono con le attività della pianta, e controllo della microfauna avversa.

Altro effetto importante è il maggiore sviluppo della rizosfera. Le ife del fungo si comportano come delle radici supplementari, capaci, di esplorare maggiori volumi di suolo e accedere a spazi tra le particelle del suolo in cui le radici per via delle loro maggiori dimensioni, non possono esplorare. Alcuni ceppi di *Trichoderma* sono in grado di produrre stimolatori di crescita come la gibberellina GA3, e molecole correlate all'acido indolacetico. (Benitez et al. 2004, A. Salas, -Marina et al. 2011).

Ceppi di *Trichoderma* inoltre sono in grado di solubilizzare varie sostanze e ridurre gli ossidi, liberando così gli ioni metallici e rendendoli disponibili per la pianta, (Altomare et al. 1999). *Trichoderma* è molto importante in agricoltura biologica, sia per le sue doti di antagonista di patogeni, sia per la sua capacità di degradazione di sostanze come gli idrocarburi complesse e a volte difficili per la presenza di legami chimici complessi che solo grazie ai suoi enzimi possono essere rotti.

Tutte le specie inoltre presentano la capacità di interagire con i metalli pesanti, fornendo così un'ulteriore protezione alle piante che crescono in ambienti degradati, con elevate concentrazioni di metalli pesanti, molti dei quali tossici. Si sa da moltissimo tempo che i funghi, ma anche altri microrganismi che crescono in ambienti ad elevata concentrazione di metalli pesanti presentano un'elevata tolleranza e un buon adattamento. I primi studi nel settore risalgono agli anni 60 (Ashida, 1965). Tuttavia anche ceppi cresciuti in ambienti non inquinati mostrano capacità di adattamento ad ambienti difficili. Ad esempio nel nostro esperimento il ceppo usato non proveniva da siti inquinati, ma è stato comunque in grado di vivere e crescere in ambienti a concentrazioni elevate di rame.

#### 4.4 *Trichoderma* e i metalli pesanti

Molti funghi hanno la capacità di assorbire i metalli pesanti, spesso con conseguenze utili all'ambiente e alle piante che vivono in territori a forte inquinamento ambientale.

*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, sono funghi molto diffusi un po' in tutte le latitudini, con buone tolleranze e quasi tutte le loro specie presentano una buona tolleranza ai metalli pesanti, tanto da attirare un forte interesse da parte di molti ricercatori nell'ambito delle metodologie per bonificare suoli a forte inquinamento.

Il loro più grosso limite è tuttavia la loro tossicità e spesso, la loro patogenicità su piante, ma anche su animali, che li rende sovente inutilizzabili o crea problemi di gestione non indifferenti. Anche molti patogeni delle piante presentano grandi capacità di assorbimento di metalli pesanti, come ad esempio *Armillaria*, *Amanita* e *Rosellinia*,

I funghi del genere *Trichoderma*, con le loro caratteristiche di saprofiti, non fanno eccezione, e spesso si presentano come ottimi candidati per interventi in ambito di bioremediation, sia per la loro relativa facilità di coltivazione e impiego, sia per il fatto di non essere dei patogeni, anzi le loro doti di antagonisti, li rende particolarmente interessanti, per ottenere un duplice risultato. La lotta ai patogeni e un meccanismo di filtro biologico contro gli inquinanti.

Le specie di *Trichoderma* ad oggi note sono più di 100. La maggior parte di esse sono quasi ubiquitarie e tutte sembrano essere in grado di interagire con i metalli pesanti. Tuttavia permane una certa diversità anche tra le specie. Alcune interagiscono solo con alcuni elementi, altre invece sono più versatili. Il meccanismo di assorbimento è variabile. In alcune specie è volontario ed attraverso l'uso di enzimi che attaccano persino i reticoli dei minerali pur di estrarre l'elemento. In altri casi si tratta di una semplice

affinità tra la parete corticale delle ife e l'elemento chimico o un mix delle due cose.

Si nota in particolare una buona affinità tra *Trichoderma* e molti vicarianti del piombo, come zinco, manganese molibdeno, e in genere per tutti quegli elementi chimici che hanno numero di ossidazione  $2^+$ , ma non è una regola assoluta. Cromo e ferro vengono assorbiti anche pur avendo numeri di ossidazione differenti.

In uno studio del 2009 di H. I. Atagana si notava l'attività inibitoria di Nichel e Cadmio su *Trichoderma sp.* Non è in fondo un dato stupefacente tuttavia in quanto i due elementi sono tossici per quasi tutti i funghi e solo pochi sopportano concentrazioni elevate di essi. *Trichoderma sp.* Pur rimanendo in vita, riduceva notevolmente la sua attività, in particolare in presenza di cadmio.

Un ulteriore studio del giugno 2015 di Teng Y et al. mette in evidenza la capacità di *Trichoderma reesei* di migliorare la phytoremediation in un suolo contaminato da cadmio, agevolando anche le comunità microbiche positive. Sempre nel 2015, un articolo di Feng Qu et al. Metteva in evidenza la capacità di *Trichoderma asperellum* di resistere in ambienti con forte concentrazione di arsenico e la sua capacità di volatilizzazione, anche se questo potrebbe essere poco utile, dato che si tratta solo di uno spostamento dell'elemento, non di una sua rimozione. Kacprzak et al. in uno studio del 2014 hanno valutato la capacità di assorbimento di Cd Cr Cu Zn Ni Pb in associazione con alcune piante, in particolare alcune specie usate per biomassa. In associazione con il miscanto (*Miscanthus giganteus*) trichoderma ha dato valori di assorbimento elevati.

Altri studi nel 2014 ad opera di due ricercatori iraniani (Mosenzadeh e Shahroki) hanno confermato la capacità di rimuovere Cd da un substrato ad opera di *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei* e *Trichoderma tomentosum*.

#### **4.5 *Trichoderma* e il rame: interazioni e attività**

Le tante specie di *Trichoderma* (104, ma sicuramente sono di più), svolgono ruoli importanti nei suoli, a partire dalla loro capacità di degradazione di sostanze organiche complesse, fino ai rapporti di simbiosi con le piante e al loro ruolo di intermediazione della rizosfera. Molte sono le sostanze chimiche aggredite da questi funghi e lo stesso è per molti elementi chimici. Il rame è uno di essi, e per le sue ben note proprietà, viene frequentemente a contatto sia con le piante che con la fauna del suolo. Il meccanismo di interazione tra il fungo e il rame non è stato ancora del tutto chiaro. Di certo il fungo interagisce con l'elemento chimico, sia per meccanismi chimico fisici che si verificano spontaneamente, sia per scelta del microrganismo stesso che lo assorbe per utilizzarlo nei suoi processi metabolici.

L'attività del rame negli organismi è molto antica, si ritiene che sia iniziata con la diffusione dell'ossigeno nell'atmosfera, e in quel periodo sia stata usata dagli organismi per veicolare l'ossigeno. Ruolo successivamente preso dal ferro, almeno per gli animali superiori, mentre calamari e polpi hanno continuato ad utilizzarlo a questo scopo.

Nei microrganismi, il rame viene utilizzato in enzimi e chelanti, ma anche svolge un ruolo importante associato alle ATP e in particolare viene utilizzato in molte attività nei mitocondri delle cellule.

Riveste quindi una notevole importanza per il metabolismo del fungo che spesso incrementa la sua attività biologica in presenza di rame. Nel 2013 infatti, due ricercatori del Dipartimento di Biochimica dell'Università turca di Izmir, hanno potuto determinare il livello di attività dei mitocondri in presenza di rame e ferro. Il dato interessante è che il ferro riduce l'attività mentre il rame la incrementa, solo però nelle prime 48 ore, passate le quali, l'attività metabolica si riduce. A 56 ore comincia a diminuire fino a

stabilizzarsi su un valore decisamente più basso di quello osservato nelle fasi iniziali. Entrambi gli elementi si dimostrano importanti nel metabolismo del fungo, tuttavia a concentrazioni elevate, sul lungo periodo, il loro effetto stimolante, viene a diminuire. Diventa quindi utile evitare un eccessivo accumulo del rame nei suoli ove si va ad utilizzare il fungo come strumento di difesa biologica, in quanto esso potrebbe interferire con lo sviluppo iniziale del fungo.

Nel 2014 un altro studio interessante ad opera di J. J. Petrovic ed al. Presso l'Università di Belgrado, ha messo in evidenza un differente comportamento nella crescita di alcuni ceppi di *Trichoderma*, fra cui un ceppo di *harzianum*. Essi subiscono un rallentamento della crescita che spazia dal 20 all'80% in concentrazioni che vanno dallo 0,5 a 1 mmol. Tuttavia si è anche visto che concentrazioni inferiori da 0,25 a 05 mmol., determinano una stimolazione della crescita in molti dei ceppi esaminati dai ricercatori. I risultati mettono quindi bene in evidenza il doppio ruolo del rame come stimolatore della crescita e come elemento tossico, a seconda delle circostanze e delle sue concentrazioni.

Nel corso dello svolgimento del nostro esperimento si è più volte notato come vi fosse una differenza nella crescita delle colonie in base alle concentrazioni. Dato successivamente reso ancora più evidente dalla crescita del fungo in un mezzo liquido.

Il meccanismo di interazione tra il fungo e il metallo, pur essendo stato studiato più volte non è ancora del tutto chiarito. Già nel 2005 Purmina et al. Dell'Università di New Delhi hanno evidenziato come vi sia un interazione spontanea tra il rame e la parete cellulare del fungo, determinata da legami covalenti che agiscono anche quando il fungo non è più vitale. Alcune biomasse di *Trichoderma* sono state usate per depurare reflui. Studi effettuati al microscopio elettronico, dimostrano che il metallo si deposita come uno strato sulla superficie delle pareti cellulari.



Sono molti i lavori che dimostrano le interazioni tra i vari ceppi di *Trichoderma* e il rame, con conseguenze sia sul metabolismo, che sui suoli e sulla biomassa, che a sua volta interagisce con essi (Wei Shang Tan e Adeline Su Yen Ting 2012).

Nel 2006 Anand et al dimostrò che *Trichoderma viride* non riesce a crescere con concentrazioni di rame pari a 1000 – 5000 mg/l che sono valori molto elevati e nei fatti raggiungibili solo in liquidi industriali.

La maggior parte dei ceppi di *Trichoderma* interagiscono facilmente con il rame assorbendolo e utilizzandolo, ma non tutti allo stesso modo. Alcune specie lo assorbono più facilmente e alcune volte persino ceppi di una stessa specie possono presentare differenze

#### 4.6 Interazioni rame e *Trichoderma harzianum*

*Trichoderma harzianum* è tra i ceppi più utilizzati come strumento di biocontrollo per le sue note qualità di antagonismo e parassitismo su microrganismi patogeni. Inoltre sopporta anche forti variazioni del pH, ed è molto tollerante nei confronti anche della temperatura, essendo capace di crescere a temperature comprese tra 15 e 34°C. La produzione in laboratorio è molto facile, ed essendo un buon produttore di spore, è relativamente facile produrne in quantità e con costi relativamente bassi.

Come tutti i funghi interagisce con moltissime sostanze chimiche, parecchie delle quali tossiche o pericolose. Inoltre ha buone capacità di interazione con molti metalli, alcuni dei quali sono anche importanti per il suo metabolismo. Sono note le sue capacità di assorbire cromo esavalente, elemento molto tossico e fortemente cancerogeno, ma anche ferro, nichel zinco e piombo. Decisivo da questo punto di vista sembra anche essere il luogo di origine del fungo. In analogia con molti altri funghi infatti *Trichoderma harzianum* presenta una maggiore tolleranza e capacità di assorbimento, se originario di un sito dove il metallo è molto più diffuso. Occorre inoltre tenere conto del fatto che quando si parla di metalli si parla maggiormente di metalli bio disponibili, cioè che possono essere assorbiti dal fungo, non necessariamente tutto il metallo effettivamente presente in un suolo, che può essere legato stabilmente alle particelle del suolo.

Tuttavia i funghi dispongono di enzimi in grado di aggredire i legami chimici presenti nei cristalli e quindi asportare da essi i metalli a loro utili. Uno studio del CNR ha dimostrato infatti che *Trichoderma* è in grado di estrarre il ferro dai cristalli di alcuni minerali dell'amianto, modificandone così la struttura cristallina. Ma anche molti altri metalli vengono estratti dai funghi, anche se in alcuni casi non si riesce a stabilire se con uno scopo o per semplice affinità elettronica del metallo con enzimi o molecole che

compongono l'organismo. La sua produzione di metaboliti viene usata anche nelle industrie al posto di solventi chimici sempre più costosi e meno vantaggiosi. Tutto questo ma soprattutto le sue qualità di antagonista, lo rendono prezioso per l'agricoltura, permettendo un miglioramento delle condizioni ambientali per le piante e la possibilità di migliorare la produzione in quantità e qualità. Nelle piante di pomodoro stimola la crescita delle radici, e questo permette una crescita migliore della pianta che è così in grado di esplorare maggiori quantità di suolo.

Il rame è un elemento abbastanza diffuso nel suolo, più però per le attività umane che per ragioni naturali. Il suo uso come antiparassitario, fin dall'antichità, ne ha determinato l'accumulo nei suoli, anche a causa della sua capacità di sostituire molti elementi bivalenti, come calcio magnesio ferro, ma anche altri più tossici come il piombo o più rari, come il molibdeno o il manganese e lo zinco. Per conseguenza molti microrganismi del suolo devono abituarsi a gestirne la presenza ed eventualmente adattarsi.

*Trichoderma harzianum*, come molti altri funghi del suo ceppo, è in grado di tollerare elevate concentrazioni di rame e di altri metalli pesanti. Inoltre il suo ruolo di antagonista dei patogeni permette di ottenere una valida difesa, sia in chiave di inquinamento ambientale, sia come difesa biologica. L'interazione con il rame avviene a livello delle pareti delle ife, dove il metallo si accumula maggiormente, mentre solo in parte viene assorbito dal fungo che lo utilizza per i suoi scopi.

È noto che il rame entra in molti processi metabolici, e anche all'interno della molecola di DNA si hanno atomi di rame. Il fungo lo usa particolarmente nei processi chimici che si generano nei mitocondri, e ne veicola una parte alla pianta, che in conseguenza di questa mediazione non accumula quantità tossiche del metallo. Il meccanismo di accumulo si verifica sia per azione del fungo che assorbe il metallo per svolgere le sue

attività, sia perché le pareti ifali presentano una carica elettronegativa in grado di legare a sé lo ione. La conseguenza di questo meccanismo è che si può usare il fungo come protezione attiva e passiva, o come filtro nei confronti di sostanze nocive o per depurare reflui ricchi in rame.

Nel nostro lavoro si è cercato di fare una valutazione della capacità di crescita delle colonie del fungo in presenza di elevate quantità di rame e capire se concentrazioni elevate di esso possono influire sulle sue proprietà positive.

**Capitolo 5**  
**Obiettivo**  
**E**  
**Materiali e Metodi**

## 5.1 Obiettivo della ricerca

Il lavoro da noi svolto si colloca nel più ampio filone della bioremediation e più nel dettaglio, nell'ambito della Fungal Bioremediation. Esso ha come obiettivo l'uso dei funghi come strumento per la bonifica e la difesa dei suoli.

Inoltre il progetto opera nell'ambito della agronomia ambientale, in quanto i funghi simbiotici hanno assunto un'importanza notevole nella gestione delle malattie delle piante e ancora di più nel settore della difesa bio agronomica delle colture. Quindi diventa importante la loro interazione con le sostanze chimiche ammesse dalle pratiche colturali e quanto esse possono influire sulle colonie fungine, sulla loro crescita e sulla loro capacità di operare al meglio delle loro capacità contro i patogeni delle piante e come protezione nell'assorbimento degli inquinanti, particolarmente il rame che in agricoltura biologica è usato al posto degli antiparassitari di origine chimica.

Nel quadro delle buone pratiche di agricole, può quindi essere utile accertare se l'uso di rame in regime biologico, può avere conseguenze su *Trichoderma harzianum*, fungo simbiote opportunistica che è molto utilizzato per la sua attività antagonistica e di predazione su Nematodi e funghi parassiti delle piante.

Il lavoro si è basato sia su attività di laboratorio che su attività di campo. In laboratorio si è provveduto a fare crescere il fungo su substrati inquinati con concentrazioni elevate di rame, mentre le attività di campo hanno portato alla raccolta di un discreto numero di campioni di suolo allo scopo di determinare i tenori di rame presenti in alcuni suoli siciliani.

I dati così ottenuti, permetteranno di valutare l'utilizzo del ceppo in chiave di difesa biologica.

## 5.2 Materiali e Metodi

Il primo passo da svolgere è stata la selezione del ceppo più idoneo ai nostri scopi.

La scelta inizialmente focalizzata su due ceppi di *Trichoderma*, si è concentrata su uno dei due in quanto rivelatosi dotato di una forte carica antagonistica. Un buon candidato quindi per la lotta biologica e per il quale poteva essere interessante valutare la capacità di resistenza in un ambiente ostile, come può essere un substrato contenente elevate concentrazioni di rame sotto forma di solfato.

Il ceppo di *Trichoderma harzianum* CECT 2413 è stato acquistato dal CECT di Valencia (Spagna) in quanto oltre ad essere una struttura adeguatamente attrezzata, ha presentato costi minori rispetto al CMI di Londra (G. Bretagna), sia per quanto riguarda il costo che per le spese di spedizione.

Il ceppo è stato inviato sotto forma di prodotto liofilizzato, e la prima fase del lavoro è consistita nel riattivare il ceppo inoculandolo su piastra di Petri con PDA + Streptomicina, per prevenire contaminazioni batteriche.

Solo dopo avere risvegliato il ceppo e averlo identificato tramite analisi al microscopio, sfruttando le caratteristiche morfologiche delle colonie, sia microscopiche che macroscopiche, si è provveduto a dare il via all'esperimento.

In una fase iniziale dell'esperimento si è considerato un quantitativo relativamente più modesto di solfato di rame ad un ph costante per potere valutare la reazione del fungo alla presenza della sostanza, da sempre nota per le sue caratteristiche di fungicida.

Dopo avere constatato l'efficacia del fungo, che a relativamente basse concentrazioni di solfato di rame presentava valori di crescita molto simili a quelli in condizioni normali (Piastra di Petri con PDA privo di sostanze

tossiche), si è passati a concentrazioni di rame più elevate allo scopo di valutare la capacità del fungo di crescere anche in ambienti dove vi sono grandi concentrazioni di solfato di rame e allo scopo, in seguito, di valutare il quantitativo di rame da esso assorbito e la sua efficacia come protettore della pianta anche in condizioni di stress, basandosi sulla crescita delle colonie.

Allo scopo di ottenere una situazione più prossima alla situazione reale, si è utilizzato il solfato di rame normalmente presente in commercio, al posto di quello comunemente usato in laboratorio, con ulteriore vantaggio in termini economici.

Contemporaneamente al lavoro di laboratorio si è predisposta una raccolta di campioni di terreno in alcune aree della Sicilia occidentale, particolarmente utilizzate e da tempo utilizzate per la viticoltura, in modo da potere avere anche dei dati il più possibile precisi sulla concentrazione del rame nei suoli dediti a questa pratica. Si è aggiunto poi ad essi i dati provenienti dal suolo di un nespoletto a conduzione biologica e di alcuni terreni incolti da più di dieci anni per avere un quadro il più possibile completo della concentrazione di rame nei suoli siciliani, sia considerando coltivazioni che in altri paesi sono poco diffuse o del tutto assenti che il semplice effetto dell'inquinamento ambientale.

Infine si è determinato il quantitativo di rame assorbito dal fungo durante la crescita su piastra per valutare la sua capacità di protettore delle piante in presenza di concentrazioni elevate dell'elemento nei suoli.

La capacità del fungo di svolgere la sua funzione di protezione e stimolatore della crescita delle piante su cui viene inoculato è stata valutata sia sfruttando la crescita delle colonie sui substrati, sia la quantità di rame assorbito dal fungo e da esso trattenuto nello strato corticale delle sue cellule. Il motivo di questo meccanismo non è stato ancora chiarito. Le ipotesi più probabili sono l'affinità del metallo con le molecole che



costituiscono le pareti cellulari, capaci quindi di legarlo stabilmente e una possibile strategia del fungo che lo usa come difesa da batteri e funghi nocivi.

### **5.3 Collocazione geografica dei campionamenti**

Si sono raccolti vari campioni di suolo in un area della Sicilia occidentale dove la coltivazione dei vigneti rappresenta l'attività principale, con molti anni di esperienza in questo settore. La scelta è stata prevalentemente concentrata sui vigneti a conduzione biologica, un settore che negli ultimi tempi ha avuto un forte incremento, sia per ragioni dovute all'incentivazione di pratiche colturali biologiche, sia per una necessità di sostituire la coltivazione per la produzione di massa con tecniche colturali e varietà più idonee a fornire prodotti di qualità e mirati ad una fascia di consumo più selezionata, in quanto economicamente più vantaggiosa e più sostenibile.

Le aziende coinvolte, si trovano in territori diversi, spesso distanti tra loro e in comuni diversi, anche se quasi tutte si collocano nel territorio del Belice. I comuni in cui si trovano sono, San Giuseppe Jato, San Cipirello, Partinico, Monreale, Poggioreale, Salaparuta, Santa Margherita Belice, Piana degli Albanesi, Gibellina, Menfi, Palermo.

Oltre che nei vigneti a conduzione biologica, si sono prelevati campioni da vigneti a conduzione convenzionale e aree incolte da più di dieci anni. Infine si sono presi dei campioni pure da un nespoieto a conduzione biologica, situato nei pressi di Palermo, in quanto anche questo tipo di coltivazione fa uso di solfato di rame.

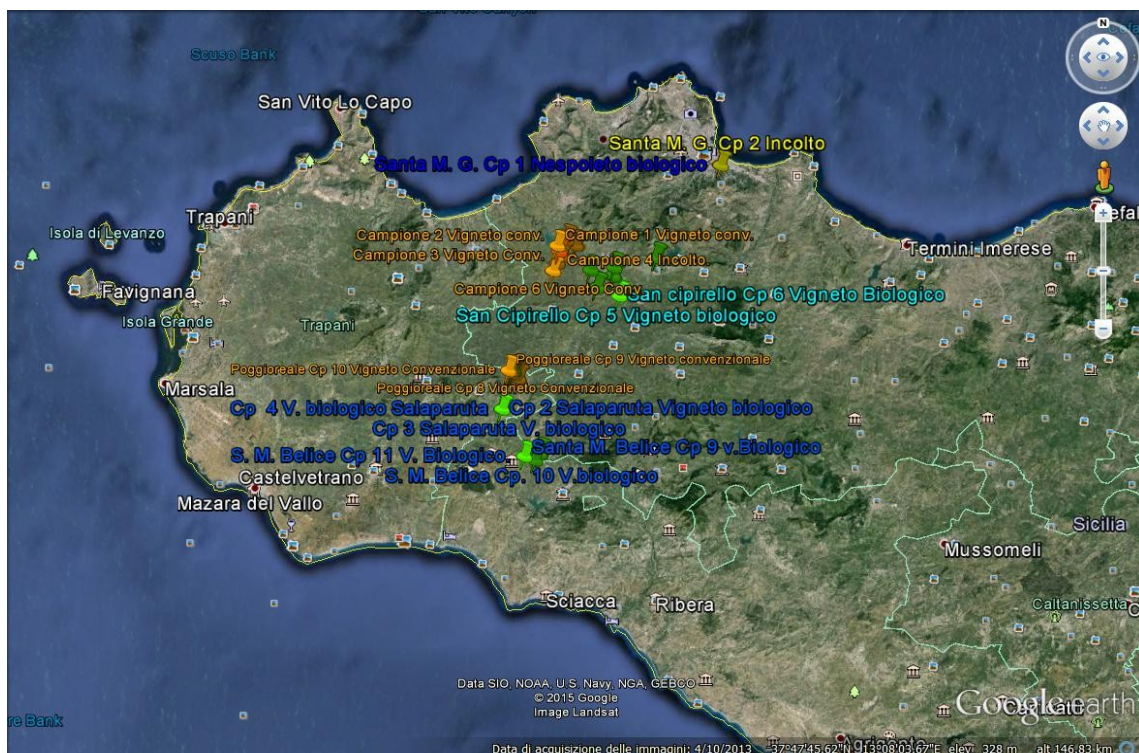


Fig. 7 Posizione geografica dei campioni di suolo. (Google Earth.)

Come si può facilmente vedere in carta, i campioni coprono un'ampia fascia di territorio Siciliano, quasi da una costa all'altra dell'isola. E coprendo tutta la fascia del vino della valle del Belice. I suoli presenti in questa zona della Sicilia derivano da formazioni rocciose composte in prevalenza da argille e calcareniti. In alcuni territori la matrice è prevalentemente arenacea, ma in prevalenza si tratta di suoli a matrice argillosa, maggiormente capaci di interagire con i cationi per la minore dimensione delle particelle che li costituiscono, e per la ben nota capacità di scambio cationico. Questa caratteristica è particolarmente utile, in quanto il rame verrà più facilmente trattenuto in suoli argillosi, che in suoli arenacei o litoidi.

È una zona a forte vocazione agricola con prevalenza di oliveti e vigneti. Tuttavia, si è scelto di effettuare una campionatura anche in un terreno totalmente diverso, sui Monti di Palermo, in un nespoieto a conduzione biologica, e un terreno incolto da dieci anni adiacente a quest'ultimo, allo

scopo di valutare il tenore di rame in un'area molto prossima alla città e in una coltivazione che a sua volta fa utilizzo di rame come antiparassitario.

I campioni sono stati raccolti molto facilmente, rimuovendo la lettiera superficiale e mantenendosi nei primi 25 cm di suolo, in quanto in questa parte del terreno si accumulano gli apporti di rame più recenti, che con il tempo tenderanno a migrare e accumularsi verso il basso, soprattutto per azione delle acque, di irrigazione e di precipitazione.

Allo scopo di evitare il più possibile condizionamenti dall'esterno, si è scelto di prendere i campioni nelle parti più centrali del vigneto o dell'appezzamento, e possibilmente e compatibilmente con le situazioni, il più prossime possibili all'orizzonte non lavorato o che subisce meno lavorazioni. I campioni così raccolti sono poi stati posti su carta alluminio e chiusi in buste di plastica, per ridurre al minimo i contatti con l'esterno.



Fig. 8 Campione di suolo appena prelevato. La raccolta su carta alluminio permette una prima discriminatura dei resti della lettiera presenti. (Di Bella V.)

Inoltre permette già in prima approssimazione di farsi un'idea di alcune caratteristiche del suolo campionato, come ad esempio la presenza di scheletro e dimensioni e forma degli aggregati.

## **5.4 Determinazione del contenuto di rame nei suoli**

La quantità di rame in un suolo non è mai la stessa e dipende da vari fattori. Alcuni sono naturali, e dipendono dalla mineralogia della roccia di origine del suolo, dalle acque circolanti all'interno dei suoli, ma anche da quelle che scorrono sulla superficie e si infiltrano, anche le attività degli organismi viventi possono apportare quantità di rame nei suoli.

Tuttavia, nella maggior parte dei casi, sono le attività antropiche che determinano un aumento consistente nella concentrazione di metalli ed altri elementi chimici nei suoli.

Il rame è molto utilizzato per le sue molteplici qualità e caratteristiche in molti settori. Per conseguenza la sua concentrazione negli ambienti è molto aumentata, fino a determinare anche problemi di tossicità anche per piante e animali superiori.

Particolarmente importante nei terreni agrari è il tipo di coltivazione, visto che solo alcune colture prevedono l'impiego del rame, mentre per alcune altre gli apporti di rame sono minori, in quanto lo si può comunque trovare come impurità in concimi e ammendanti o in altri prodotti agricoli.

Per il nostro studio, abbiamo preso in considerazione campioni di suolo provenienti da un nespolo, da vigneti e da suoli incolti, allo scopo di potere avere una stima del tenore di rame in situazioni in cui si utilizza il rame, anche in grandi quantitativi, e suoli dove invece ve ne dovrebbe essere meno o la sua presenza è determinata da altre fonti.

La procedura di determinazione si è basata su pochi semplici passaggi.

Nella fase iniziale, il campione è stato esaminato, rimuovendo a mano gli elementi più grossolani dello scheletro ed eventuali frammenti macroscopici di materia organica, alcune volte si è trattato anche di residui di provenienza antropica (frammenti di vetro).



Il materiale così selezionato è stato poi sottoposto a un pestaggio in mortaio allo scopo di rompere gli aggregati e separare le particelle fini.

Successivamente si è passato il materiale al setaccio di diametro 1 mm allo scopo di rimuovere tutto il materiale più grossolano fino alle sabbie fini e i limi, ed ottenere solo le particelle argillose.



Fig. 9 Operazioni di setacciatura. Mortaio e setaccio. (Di Bella V.)

Nella fase successiva si è prelevata la quantità di materiale necessario per la procedura di mineralizzazione e analisi.

Anche se il materiale necessario per le analisi è molto limitato, (250 mg), tuttavia l'utilizzo di quantitativi maggiori, permette di avere una stima migliore, dato che il materiale analizzato viene preso casualmente.



Fig.10 Pesatura del campione di suolo (Di Bella V.)

Avere una grande quantità di materiale da cui prelevare il campione da mineralizzare per l'analisi spettrometrica, permette di avere una selezione casuale delle particelle e quindi una maggiore oggettività del dato, anche se occorre più tempo e lavoro. I campioni pesati sono stati messi in provetta e poi mischiati con acqua demineralizzata 3 ml e con acido nitrico puro al 99% 1 ml.

Successivamente si sono lasciate riposare le provette per 24h in modo che l'acido disciogliesse tutta la sostanza organica presente e poi si è portato il volume della provetta a 10 ml con acqua demineralizzata. I campioni così ottenuti sono stati poi preparati per l'analisi con lo spettrofotometro di massa per determinare il contenuto di rame.

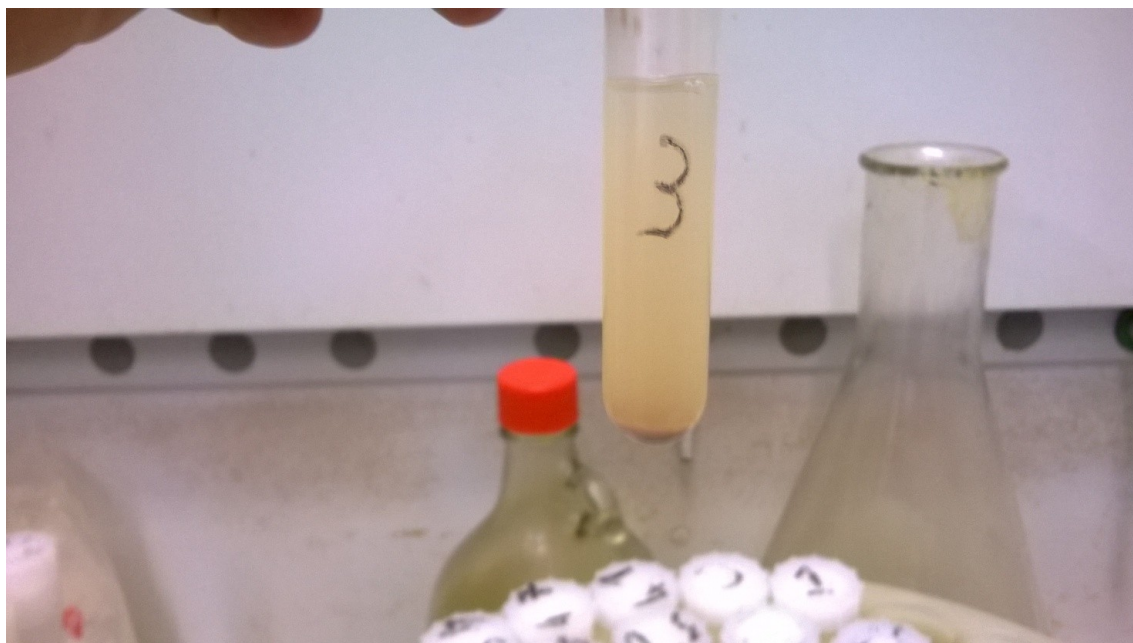


Fig.11 Campione di suolo in provetta diluito con acqua demineralizzata e acido nitrico. (Di Bella V.)

I tenori di rame nei suoli siciliani non hanno rivelato particolari sorprese. Il contenuto in rame è risultato più elevato rispetto a quanto si potrebbe ipotizzare in un primo momento. Tuttavia è da tenere conto che il rame si accumula facilmente nei suoli e si lega facilmente alla sostanza organica e alle particelle argillose, grazie al suo raggio ionico e alla carica elettrica.



Tuttavia del quantitativo di rame ottenuto, occorre tenere conto che non tutto risulterà effettivamente disponibile. Secondo stime determinate sperimentalmente si ritiene che il rame effettivamente disponibile, e quindi captabile dal fungo o dalle piante sia più probabilmente 1 o 2% del dato ottenuto. Quest'ultimo, unito con le conoscenze acquisite sul fungo *Trichoderma harzianum*, fanno supporre che il fungo non abbia particolari difficoltà a crescere anche nelle situazioni più problematiche rilevate nel nespoieto e in un terreno incolto nei pressi della città di Palermo, dove l'elevato tenore di rame potrebbe avere altre origini, piuttosto che l'uso come fungicida.

Contenuto di rame			
Suoli		ppb misurati	microg nei 10 ml preparati
Campione 1		1,476	7,38
Campione 2		0,78	3,90
Campione 3		0,805	4,03
Campione 4		1,391	6,96
Campione 5		1,199	6,00
Campione 6		1,106	5,53
Campione 7		0,792	3,96
Campione 8		13,26	66,30
Campione 9		0,48	2,40
Campione 10		0,78	3,90
Campione 11		0,949	4,75
Campione 12		4,189	20,95
Campione 13		1,104	5,52
Campione 14		15,97	79,85
Campione 15		0,941	4,71
Campione 16		6,506	32,53
Campione 17		0,977	4,89
Campione 18		0,907	4,54
Campione 19		0,925	4,63
Campione 20		12,33	61,65
Campione 21		1,134	5,67
Campione 22		0,68	3,40
Campione 23		0,868	4,34
Campione 24		1,603	8,02
Campione 25		0,801	4,01
Campione 26		0,377	1,89

Tab. 1 Contenuto di rame nei suoli campionati. (Di Bella V.)

## 5.5 Produzione del ceppo *Trichoderma harzianum*

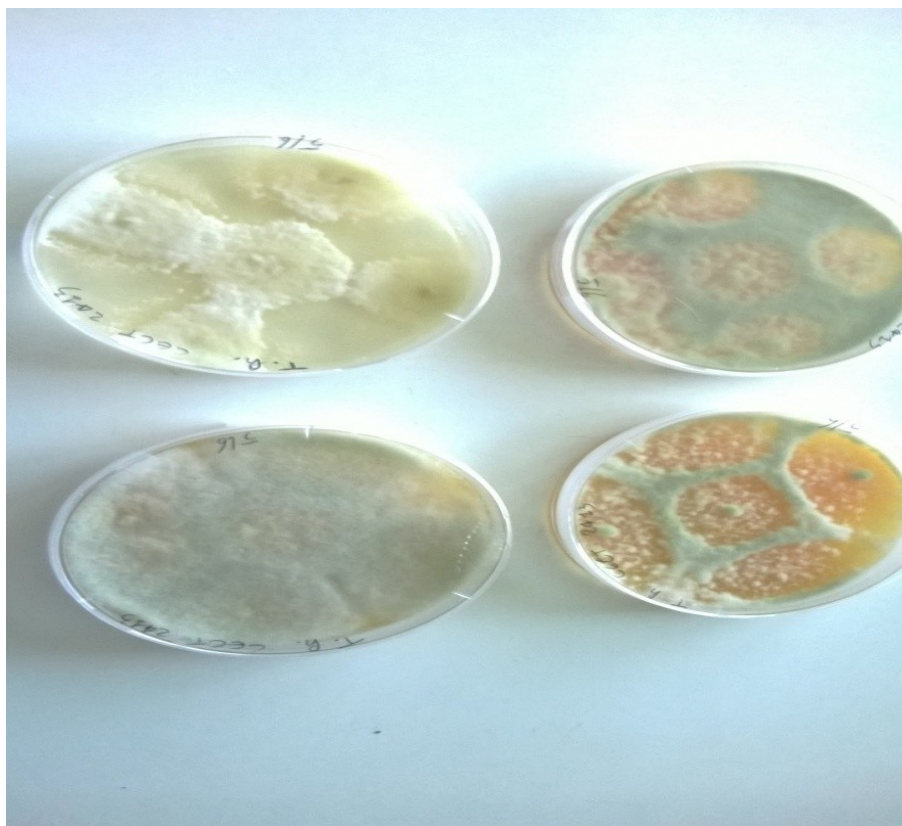


Fig. 12 Piastre Petri con le colonie di *Trichoderma harzianum* reidratato. (Di Bella V.)

Il ceppo di *Trichoderma harzianum* usato nell'esperimento, non è autoctono della Sicilia. Spesso negli esperimenti di interazione tra funghi e metalli pesanti si utilizzano funghi autoctoni o comunque selezionati dal sito inquinato. Le ragioni sono in prevalenza due: il fungo che cresce in presenza di una sostanza tossica è sicuramente in grado di tollerarne la presenza, quando addirittura non lo assorbe e lo sfrutta per i suoi scopi. La seconda ragione è la possibilità di ottenere un ceppo efficiente da impiantare in siti con caratteristiche analoghe facilmente e a costi relativamente bassi. I vantaggi tuttavia, si scontrano con dei limiti.

Il primo di essi è che spesso si tratta di funghi patogeni o in grado potenzialmente di produrre danni anche rilevanti. Infatti molti tra i funghi più resistenti agli inquinanti risultano appartenere ai generi *Aspergillus*,

*Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*. Tutti potenzialmente pericolosi per piante e coltivazioni, e in alcuni casi o situazioni, anche per la salute umana.

Un altro problema è dato dalla possibilità di fare crescere il fungo su opportuni substrati di crescita e produrne in quantità sufficienti per lo scopo richiesto. Non tutti i funghi prediligono lo stesso substrato di crescita, e alcuni o non crescono, o la loro crescita è fortemente inibita se vi sono colonie di altri funghi, a crescita più rapida e aggressiva. Anche se il *Trichoderma* non appartiene a questo genere di funghi, semmai è un forte antagonista e predatore di altri funghi, si è preferito scegliere un ceppo le cui caratteristiche di antagonista fossero documentate. Nel caso specifico dal CECT di Valencia.

Il ceppo è stato acquisito ed è stato consegnato sotto forma liofilizzata. Per riattivarlo è bastato reidratarlo con un opportuna dose di acqua demineralizzata sterile nelle dosi indicate per poi versare il liquido così ottenuto sulle piastre di crescita contenenti PDAS (Potato Dextrose Agar + Streptomycin).

In circa 48 h si sono cominciate a formare le prime colonie che nei successivi quattro giorni hanno completamente colonizzato le piastre di crescita, sigillate con pellicola parafilm per prevenire eventuali contaminazioni.

A questo punto ci si è sincerati che il fungo cresciuto fosse effettivamente *Trichoderma harzianum*, sfruttando il riconoscimento degli aspetti macroscopici e microscopici delle colonie. Forma e caratteristiche delle ife, spore, e il caratteristico colore verde hanno contribuito a identificarlo senza più dubbi. Anche la velocità di crescita è risultata significativa. Il *Trichoderma* infatti è un fungo a crescita rapida, anche in presenza di altri funghi, e sopporta facilmente anche situazioni ambientali non del tutto favorevoli. Questo è stato uno dei motivi che hanno contribuito a sceglierlo come soggetto dell'esperimento.

## 5.6 Crescita su substrato inquinato

A seguito dell'avvenuta reidratazione si è potuto procedere con l'esperimento di crescita su substrato inquinato.

Del ceppo studiato conoscevamo la capacità antagonistica, mentre mancano del tutto le informazioni riguardo la sua capacità di crescita in condizioni di stress da inquinamento.

La prima fase dell'esperimento è stata condotta producendo piastre Petri in cui è stato disciolto del solfato di rame  $\text{Cu SO}_4$  del tipo facilmente reperibile in commercio. Il motivo della scelta rispetto a un prodotto di laboratorio è stata la consapevolezza che usare il prodotto commerciale avrebbe permesso di ottenere una risposta più prossima a quella reale. Il prodotto di laboratorio, infatti ha standard di purezza nettamente superiori rispetto al prodotto commerciale, ma d'altra parte, il prodotto commerciale potrebbe contenere impurità che potrebbero determinarne una maggiore tossicità. Questo in quanto al rame spesso sono associati altri elementi chimici come Pb, Zn, Ni, Cd, Mo, che sono per alcuni organismi ancora più tossici. Inoltre è il tipo di materiale che il fungo troverebbe nei suoli.

Per realizzare l'esperimento si è proceduto alla produzione di un quantitativo di PDA per riempire un totale di dieci piastre Petri diametro standard 10 cm. Il preparato è stato poi messo in autoclave e sterilizzato tenendolo per 20 minuti a  $120^\circ\text{C}$ . e pressione di 4 bar.

Successivamente in camera di flusso si sono riempite due piastre con il PDA semplice, in modo da avere un controllo della crescita per le due repliche, mentre il restante PDA è stato inquinato con 37,5 mg di solfato di rame e successivamente versato nelle piastre, in modo da avere due repliche dell'esperimento.

Le piastre, chiuse in buste di plastica preventivamente sterilizzate con alcol, sono state lasciate per 48 ore a riposo per controllare che non si fossero

verificate contaminazioni, e successivamente inoculate con un frammento di colonia di *Trichoderma harzianum* di circa 25mm<sup>2</sup> e successivamente, nuovamente imbustate e tenute in ambiente chiuso e in penombra.

I primi segni di crescita delle colonie si sono avuti dopo le prime 48 ore. Il controllo a quel punto era già a 31 cm. Tuttavia le piastre inquinate con il solfato di rame non erano meno attive e la differenza massima riscontrata sugli assi di crescita era al massimo di due o tre millimetri.

Morfologicamente non presentavano differenze con il controllo, sia come forma che come colore. Dopo cinque giorni le colonie, incluse il controllo avevano già colonizzato tutta la piastra, determinando così la fine dell'esperimento.

I valori calcolati sia come crescita che come indice di attività, non presentavano differenze particolarmente evidenti variando da un massimo del 16% fino al minimo del 3%. Nel caso della replica la forbice diminuiva ulteriormente e oscillava da 8% a 3%, indicando una quasi omogeneità della crescita nelle due condizioni.

Assi principali di crescita	1	2	3	4
piastre				
1	2,6	3,1	2,6	2,8
2	2,9	2,8	2,6	2,7
3	2,9	3	2,7	2,8
4	2,8	2,9	2,6	2,7
controllo	3	3,2	3,1	2,9

assi principali di crescita	1	2	3		4
piastre					
1	3,2	3,3	3,3		3,3
2	3,1	3,2	3,3		3,4
3	3,2	3,5	3,2		3,3
controllo	3,4	3,5	3,4		3,6

Tab. 2 Dati di crescita delle colonie in PDA con 37,5 mg di solfato di rame.

La conclusione dell'esperimento, indicava quindi che il quantitativo di solfato di rame impiegato nell'esperimento non comprometteva affatto le capacità di resistenza del fungo al rame, e non ne compromette la crescita, che in tutti i casi presentava un ritardo sia in termini di dimensioni che di tempo assolutamente non in grado di ostacolarne l'attività vitale o le sue doti di antagonismo o i rapporti di simbiosi con la pianta.

A seguito del risultato ottenuto, si è scelto di modificare l'esperimento, allo scopo di provare a trovare un valore soglia oltre il quale il fungo non è in grado di crescere, o viene ucciso dal solfato.

Molti lavori consultati, presentano coltivazioni su piastra con concentrazioni decisamente elevate, più di quanto ci si aspetterebbe in natura, spesso orientate alla bioremediation e alla depurazione di reflui industriali, ma anche di siti dove le attività umane determinano l'accumulo di materiali tossici ben oltre livelli che si possono considerare naturali.

I funghi hanno dimostrato molte volte di essere in grado di crescere anche in queste situazioni. Soumik Sarkar, Annamalai Satheshkumar, Robert Premkumar per esempio, nel 2013 hanno testato un ceppo di *Trichoderma harzianum* con il cromo. Le concentrazioni proposte erano molto prossime a quelle usate da noi.

La procedura seguita è molto simile a quella precedente. Si è preparato il PDA e lo si è posto in autoclave insieme ai quantitativi pesati di solfato di rame che si intendevano usare, e variabili da un minimo di 50 mg fino a un massimo di 800 mg.

Successivamente si è versato il solfato di rame sterilizzato nella piastra insieme con il PDA liquido e ancora caldo, per agevolare lo scioglimento e rendere il più possibile omogeneo il composto così ottenuto.

Le piastre così ottenute sono state poste a riposo per 48 ore in modo da essere certi che non avvenissero fenomeni di contaminazione ad opera di altri funghi o batteri, e solo dopo si è posto al centro di esse un quadrato di

micelio di *Trichoderma harzianum* di circa 25 mm<sup>2</sup> di lato, come già in precedenza.

L'operazione è stata fatta due volte, in modo da avere una replica dell'esperimento.



Fig. 13 Solfato di rame in carta alluminio preparato per la sterilizzazione in autoclave. (Di Bella V.)

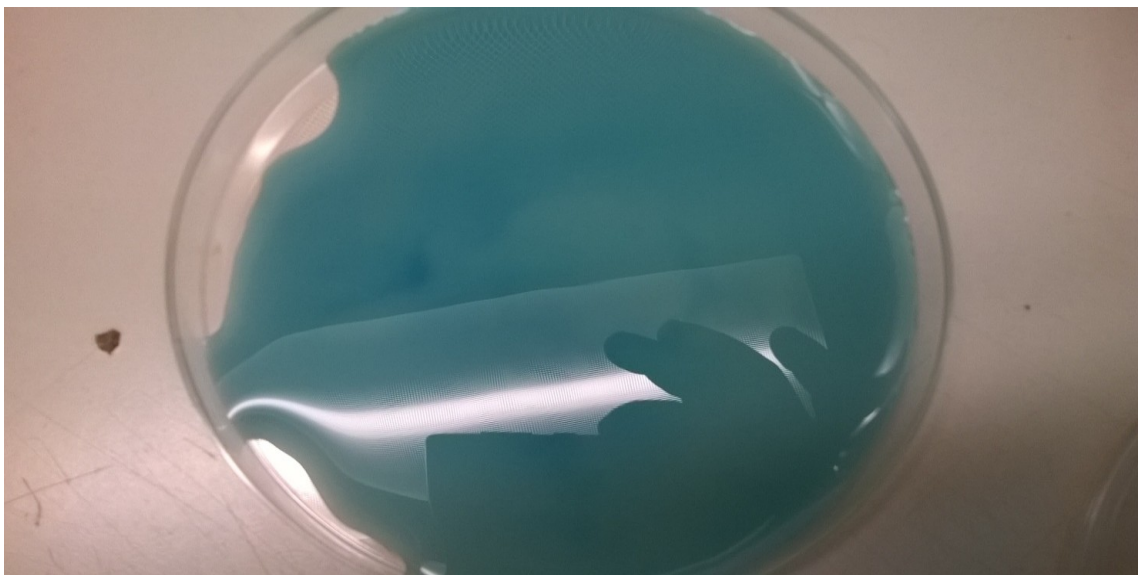


Fig. 14 Piastra Petri con PDA inquinato con solfato di rame. (Di Bella V.)

In questo esperimento si è cominciato a vedere delle differenze decisamente più evidenti nel modo di crescita del fungo rispetto al precedente. Il fungo rallenta decisamente la sua crescita, al punto che dopo circa 48 ore, non si è più registrata una crescita evidente della colonia. I primi segnali macroscopici della crescita della colonia si sono avuti tre giorni dopo l'inoculo, dopo circa 72 ore, quando la colonia ha mostrato crescite dell'ordine di alcuni mm. Il controllo invece nello stesso periodo di tempo aveva avuto crescita analoga a quella riscontrata nel precedente esperimento e più in generale, in linea con quelli che sono i normali tassi di crescita delle colonie del genere *Trichoderma* in situazioni normali.

28-nov	50	100	200	300	400	500	600	700	800	c
1	9	10	6	6	3	4	4	2	2	25
2	12	12	11	10	6	12	10	1	4	25
3	12	15	8	10	15	14	14	9	10	46
4	26	19	14	10	20	15	18	16	15	53
5	27	28	15	16	22	17	20	21	26	67
6	34	34	23	29	23	34	30	25	32	71
7	37	38	31	36	25	38	35	30	38	75
8	39	39	33	38	31	47	46	36	43	75
9	45	59	58	46	55	56	58	57	57	75
10	67	75	75	75	67	70	67	65	62	75
11	70	75	75	75	68	74	72	68	68	75

Fig. 15 Tabella dei dati di crescita dell'asse maggiore di una colonia di *Trichoderma harzianum*. (Di Bella V.)

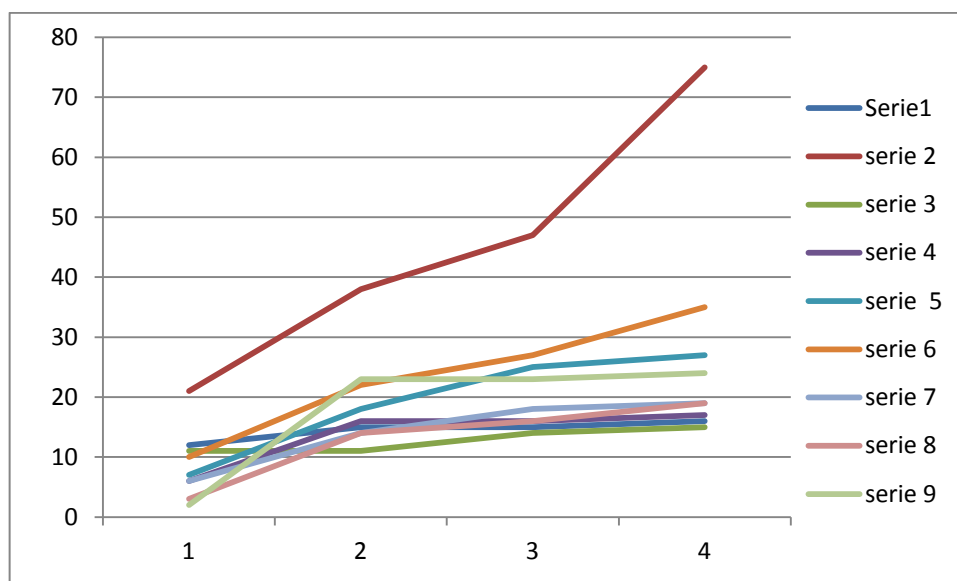


Fig. 16 Grafico della crescita lungo l'asse maggiore di una colonia di *Trichoderma harzianum*. Si nota bene la differenza tra il controllo e le piastre inquinate.



La prima prova ha permesso anche di fare degli aggiustamenti, a volte necessari per migliorare la qualità del lavoro.

Nella successiva replica abbiamo sciolto in acqua sterile il solfato di rame, per poi mescolarlo al PDA dopo la sterilizzazione in autoclave.

Questo allo scopo di diluire il nutriente rendendolo meno disponibile e contemporaneamente migliorare la solubilità del solfato, così da portare meglio in contatto il rame con il fungo.



Fig. 17 Fiasche con solfato di rame diluito in 10 ml di acqua demineralizzata, pronte per la sterilizzazione.(Di Bella V.)

Il risultato è stato un miglioramento della solubilizzazione, tuttavia questo ha anche comportato il dover versare rapidamente e a caldo il solfato, con qualche difficoltà a maneggiare le ampolle calde.

L'inoculo è stato fatto come sempre dopo due giorni, monitorando le piastre in modo da essere certi della mancanza di contaminazioni. In questo caso si è però dovuto attendere un certo periodo di tempo prima di avere la crescita del fungo. Dopo due giorni dall'inoculo infatti, solo il controllo mostrava già una crescita della colonia, con un raggio di circa 2 cm. Nelle successive 48 h si osservavano segni di crescita anche sulle altre

piastre, dove la presenza del solfato di rame determinava una netta riduzione della crescita.

Anche la forma delle colonie e il colore si modificava. Il fungo diventava di colore marrone scuro, piuttosto che bianco virante al verde, e con una crescita della colonia irregolare, privilegiando alcune direzioni, piuttosto che una crescita radiale omogenea.

La crescita è risultata abbastanza lenta da richiedere molto più tempo del previsto. Per conseguenza, mentre nel primo caso si è chiuso l'esperimento appena il controllo ha raggiunto il bordo della piastra che era del diametro di 15 cm, per raggiungere il quale sono bastati otto giorni, mentre le altre piastre non sono state riempite completamente, anzi in otto giorni, non si sono neanche avvicinate al bordo.

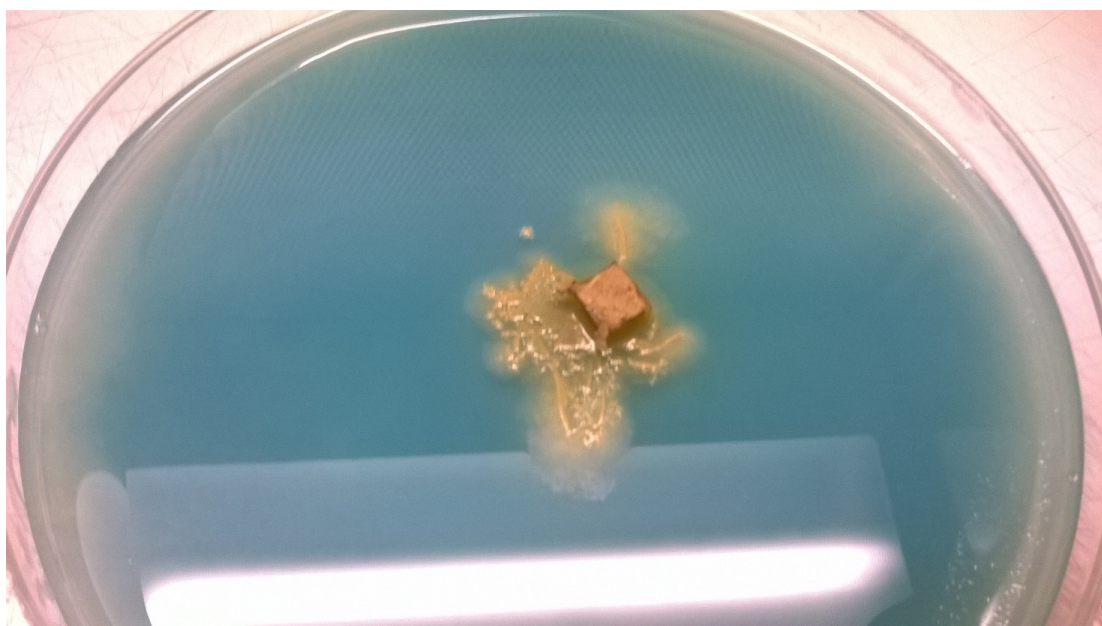


Fig. 18 Colonia di *Trichoderma harzianum* a circa sei giorni dalla collocazione in piastra. Noto sia l'aspetto che la crescita irregolare. (Di Bella V.)

Nella seconda serie, si è scelto di continuare ad effettuare le rilevazioni ogni tre giorni, fino a quando tutte o la maggior parte di esse non avessero raggiunto il margine.

Tuttavia a 30 giorni dall'inizio dell'esperimento, le colonie non hanno raggiunto il margine della piastra, se non in tre casi: le piastre con 100, 200 e 300 mg di solfato, rispettivamente.

Tutte le altre risultano invece indietro, in alcuni casi anche di parecchio, come si può facilmente vedere dai dati in tabella.

## **5.7 Recupero e misurazione del rame assorbito**

L'esperimento è stato replicato altre dieci volte e nel mentre si è cercato anche di mettere a punto un metodo per potere recuperare il micelio delle colonie e potere quindi estrarre dal micelio il rame eventualmente assorbito. La maggioranza dei ricercatori che ha fatto prove analoghe, ha utilizzato mezzi liquidi per determinare l'assorbimento, tuttavia le condizioni in un mezzo liquido sono diverse da quelle normalmente presenti nei suoli, dove si ha un substrato solido e normalmente si hanno solo periodi di umidità o di suolo saturo limitati.

Il problema di estrarre e determinare il quantitativo di rame senza ricorrere a un mezzo liquido non era dunque facile e non è stato del tutto risolto, date le caratteristiche del fungo e del substrato di crescita. A temperature troppo elevate il fungo si deteriora e potrebbe perdersi parte di esso e del rame assorbito. Il PDA d'altra parte con il calore tende a cristallizzare e per conseguenza rende impossibile il recupero del micelio che resta imprigionato all'interno. La necessità di avere una valutazione della crescita delle colonie, d'altra parte rendeva necessario l'utilizzo di un mezzo solido.

Per cominciare si sono poste le piastre in stufa a una temperatura di 65/70°C. allo scopo di sciogliere il PDA e potere liberare il micelio fungino. Per diminuire al massimo il rischio di cristallizzazione del substrato, si è posto sulla piastra un velo di circa 10 ml di acqua demineralizzata per ogni piastra e si sono lasciate le piastre in stufa per 48 ore, controllandole ogni dodici ore circa. In un primo momento si era pensato di sterilizzare l'acqua, ma data la temperatura in stufa e le successive fasi, non vi sarebbe stato comunque motivo di preoccuparsi di un eventuale contaminazione.

Dopo 48 h le piastre sono state estratte dalla stufa e si è controllata la situazione. Alcune delle piastre, con una minore concentrazione di rame

presentavano un PDA parzialmente liquefatto, da cui è stato facilmente estratto una parte del micelio, con semplicemente l'aiuto di una spatola di metallo. Altre, con le concentrazioni più elevate (da 400 mg in poi) invece non hanno dato vita a fenomeni di liquefazione, se non in misura limitata. Il tentativo di raggiungere un livello più elevato di liquefazione aumentando la temperatura, ha solo provocato la parziale deformazione delle piastre, rendendo inutile e anche rischioso insistere, dato che il calore eccessivo avrebbe potuto alterare la plastica facendole rilasciare elementi chimici che avrebbero potuto falsare il risultato.

Nella fase successiva il contenuto delle piastre è stato filtrato in modo da cercare di recuperare quanto più materiale possibile e a questo scopo si è ripetuto il processo più volte, diluendo con acqua demineralizzata e cercando di separare il più possibile il micelio dal PDA e ponendolo su carta alluminio, in modo da ottenere quanto più micelio possibile e al tempo stesso cercando di evitare di avere presenza di substrato.

Alla fine della procedura si è provveduto a pesare il materiale ottenuto e poi lo si è posto in stufa per seccarlo e asciugarlo completamente, questa volta a 85°C.

Il campione così essiccato è stato poi pesato nuovamente e infine preparato per la mineralizzazione.

Per mineralizzare, si intende quel processo che attraverso l'uso di acido nitrico determina il completo scioglimento della materia organica, mantenendo solo gli elementi minerali presenti, che possono così essere analizzati con uno spettrofotometro, determinando la quantità.

I campioni, vengono posti in provette con 3 ml di acido nitrico e acqua demineralizzata 1 ml. Vengono poi lasciati a riposare 24 h in modo da fare fuoriuscire dalle provette eventuali gas dovuti alla nitrificazione e alla dissoluzione della materia organica. Il materiale così ottenuto viene diluito in acqua demineralizzata fino a raggiungere un volume di 10 ml e infine

viene posto in forno per altre 24 h con cicli predeterminati per durata e temperatura. Dopo questa procedura viene messo nello spettrofotometro, dove viene determinata la quantità dell'elemento chimico cercato.

Lo strumento in dotazione al Dipartimento SAF ha un buon livello di precisione e permette di lavorare anche con modeste quantità, dell'ordine dei 250 mg. Ciò è stato molto utile, in quanto in alcuni casi i quantitativi di micelio non erano particolarmente rilevanti, nonostante l'impegno per ottenerli.

ppm	mg nei 10ml	peso totale	peso fungo	CuSO <sub>4</sub> mg	%
8032	80	680	20	300	402
889	9	580	20	200	44
311	3	820	360	50	1
6574	66	570	70	700	94
9014	90	1010	410	300	22
2679	27	560	290	500	9
17004	170	810	410	800	41
2892	29	800	300	100	10
39666	397	1100	460	700	86
7315	73	400	50	800	146
2607	26	490	40	600	65
6171	62	600	230	200	27
511	5	390	10	500	51
1519	15	460	140	400	11
210	2	0	0	c	0

Tab. 3 Quantità in mg di rame ottenuti dopo l'analisi del micelio.

Alcuni dati tuttavia, risultano incompatibili in virtù della differenza davvero esigua tra quantitativo di micelio ottenuto e quantità di rame rilevata dallo spettrofotometro.

Ciò ci dice che occorre ancora molto lavoro da svolgere per potere valutare appieno la capacità di assorbimento del fungo.

Tuttavia i dati già ottenuti permettono di avere un quadro della situazione, specie se si confrontano con il contenuto di rame dei suoli siciliani campionati.

Il contenuto di rame nei suoli campionati infatti, dimostra che il contenuto di rame nei suoli siciliani si attesta nell'ordine di grandezza dei



microgrammi. E questo lo mette al di sotto dei valori che *Trichoderma* ha dimostrato di tollerare senza difficoltà.

Tuttavia altri studi saranno necessari per potere valutare a pieno tutte le implicazioni del risultato.



Fig. 19 Piastre delle colonie poste in stufa a 70°C per sciogliere il PDA e recuperare la colonia. (Di bella V.)



Fig. 20 Operazioni di filtraggio e recupero del micelio. (Di Bella V.)



Fig. 21 Micelio estratto tramite filtratura. (Di bella V.)



Fig. 22 Campione pronto per essere preparato per lo spettrofotometro. (Di Bella V.)



## Discussione e Conclusioni

Questo lavoro è cominciato circa tre anni fa in Spagna a Valencia, imparando le tecniche poi applicate nel corso dei tre anni di dottorato e imparando spesso a sopperire alle eventuali carenze e difficoltà, che come sempre si presentano ogni volta che si inizia un progetto di ricerca.

Non tutte le difficoltà sono state superate e parte del risultato ne è infatti la conseguenza, costringendo a volte a tornare indietro o a interpretare meglio. L'idea di partenza prende spunto da un settore che sta gradatamente prendendo sempre più spazio e crescita in campo ambientale: la bioremediation, cioè quella metodologia di lavoro che si basa sulla capacità di molti organismi di tollerare ambienti ostili, sfruttandone le qualità positive residue e attenuando sempre più le qualità negative fino a permettere l'insediarsi di specie più sensibili. In questo campo le piante ma anche e soprattutto i microrganismi stanno assumendo una sempre più rilevante importanza, sia come strumento di bonifica e miglioramento della qualità, che come stimolatori della crescita e della produzione delle piante agrarie. Infine, come bioindicatori dello stato di salute di un suolo o anche dell'aria, basandosi su parametri quali la presenza o l'assenza di alcuni di loro, la loro crescita, o quantità.

Non è un mistero che la maggior parte di loro in presenza di alcuni elementi chimici non riescono a vivere, mentre altri invece prosperano. La bibliografia in proposito è molto numerosa e in continua evoluzione.

Questo lavoro si colloca in questo settore e al tempo stesso si va a collocare nell'ambito dell'agronomia spingendo verso quelle pratiche agronomiche tendenti a migliorare la produzione sia in qualità che in quantità, realizzando l'obiettivo non con una azione attiva fatta di interventi chimici e fisici, bensì tramite l'utilizzo e la gestione ottimale di quegli

organismi che hanno un effetto positivo sulle piante e in alcuni casi, negativo su quei fattori che possono risultare negativi per la crescita della pianta.

Il fungo *Trichoderma harzianum* si colloca tra questi microrganismi benefici per la salute delle piante e pur non essendo un simbiote obbligato, instaura con la pianta una rete di interazioni vantaggiose per entrambi.

Il rame, è un elemento importante per le piante. Oltre a svolgere un'azione antiparassitaria nota fin dall'antichità. Essa agisce con molta efficacia soprattutto sui batteri, ma anche parecchi funghi vengono uccisi e molti altri ne vengono ostacolati nei processi metabolici o rallentati nella crescita e nella proliferazione.

Ha inoltre molte funzioni vitali nelle piante e negli organismi, anche superiori, al punto che un deficit può provocare gravi scompensi. La sua attività in essi è molteplice. Penetra all'interno dei tessuti della pianta, partecipando agli scambi energetici delle cellule. Si trova all'interno del DNA e dell'RNA, permette lo scambio dell'ossigeno con un meccanismo analogo a quello svolto dal ferro nell'emoglobina, di cui si ritiene sia l'antesignano, è presente in molti enzimi utili ad innescare reazioni biochimiche altrimenti impossibili, incluse alcune relative alla fotosintesi clorofilliana e alla crescita e alla maturazione dei frutti. I segni di una sua carenza nelle piante sono clorosi più o meno sviluppate, scarsa crescita vegetativa e scarsa fruttificazione e maturazione del frutto significativamente più lenta e tardiva.

Tuttavia come tutti gli elementi chimici ha anche un livello di tossicità. Esso è più elevato di elementi come nichel, cadmio piombo, arsenico, selenio, vanadio, mercurio, per i quali il livello di tossicità è molto basso, tuttavia, a causa del suo utilizzo e della sua grande capacità di interazione con la sostanza organica e le particelle argillose presenti nei suoli, si accumula facilmente e aumenta la sua concentrazione con il tempo.

La capacità dei funghi del genere *Trichoderma* di interagire con metalli pesanti ed altre sostanze chimiche, spesso tossiche, così come di degradarle o di produrre enzimi o antibiotici con cui impedire l'attività di funghi e batteri antagonisti è nota, così come la loro capacità di interagire con le piante proteggendole e fornendo loro i nutrienti necessari che estraggono dal terreno.

Tuttavia l'attività e le interazioni tra rame e ceppi di *Trichoderma* sono ancora poco note e molti dei meccanismi vanno chiariti. *Trichoderma harzianum* è un ceppo molto noto per la sua azione antagonista, che si spinge fino alla predazione, sui funghi patogeni (*Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Penicillium*, *Phytophthora*).

Il suo utilizzo in agricoltura, particolarmente quella biologica è molto frequente in molti paesi europei. In Italia, permangono molte perplessità di base a causa della sua capacità di produrre antibiotici, anche molto potenti, che si teme possano anche ritrovarsi all'interno della pianta e dei frutti; timore particolarmente sviluppato nel caso di patate e carote, anche se fino ad ora non se ne è mai rilevata la presenza nei tuberi.

Negli ultimi tempi sta aumentando l'interesse nei suoi confronti in quanto si tende sempre più a ridurre l'utilizzo del rame in agricoltura e si cerca un'alternativa a basso costo e il più possibile naturale e di facile utilizzo.

Gli esperimenti da noi svolti, dimostrano senza dubbio che il fungo è in grado di vivere e crescere in condizioni ambientali sfavorevoli, a livelli di concentrazione del rame molto elevati. In questa situazione, il fungo continua a crescere, anche se accumula ritardi nella crescita, rilevanti fin dall'inizio. A fronte di una crescita normale che in cinque giorni lo porta a colonizzare una piastra da 10 cm di diametro, già con 50 mg di solfato di rame il fungo impiega quasi cinque giorni prima di cominciare a presentare segnali di crescita e la crescita avviene in modo decisamente irregolare. La colonia infatti non ha più un aspetto circolare. A distanza di quasi un mese

dall'inoculo, in molti casi la piastra da 15 cm di diametro non era stata ancora colonizzata del tutto. Anche nel colore mostra differenze marcate, a testimoniare e confermare l'assorbimento del rame da parte del fungo.

Tenere le colonie così a lungo ha avuto un significato proprio nel volere scoprire la capacità del fungo di resistere e crescere nonostante le condizioni ostili. In situazione normale, l'esperimento si sarebbe interrotto alla fine di una settimana circa, quando il controllo avesse raggiunto il margine della piastra. Questa scelta, difficile che ha sicuramente tolto la possibilità di determinare altri dati ha permesso di prendere atto che il fungo pur rallentando, mantiene il suo ciclo vitale e metabolico.

Il rame assorbito dal fungo, come scoperto da esperimenti di altri ricercatori, viene accumulato nelle pareti cellulari e sulle pareti delle ife. Attualmente non è ancora chiaro perché il fungo accumuli il metallo in queste parti, anche se è stato dimostrato che lo sfrutta pure per il suo metabolismo. Tuttavia, dato che *Trichoderma harzianum* tende a controllare tutta la rizosfera della pianta che colonizza, potrebbe sfruttare il rame accumulato sulle pareti delle ife come antibatterico per impedire attacchi da specie ostili, come una forma di corazza. A sua volta il rame mostra una certa affinità di legame per le proteine costituenti la parete dell'ifa e quindi si può ipotizzare lo sfruttamento di un doppio meccanismo. Da una parte una cattura volontaria del rame da parte del fungo e dall'altra un meccanismo di semplice interazione elettrostatica gestito dal fungo per procurarsi il metallo.

I suoli siciliani esaminati appartengono tutti a territori tradizionalmente vocati alla coltivazione della vite, spesso svoltasi per decenni con le stesse modalità e solo negli ultimi dieci quindici anni si è cominciato a guardare con interesse alla coltivazione con sistemi biologici. Tuttavia le analisi dei suoli da noi effettuate indicano chiaramente che il contenuto di rame in questi suoli è molto basso, nell'ordine dei microgrammi, rispetto ai dosaggi

da noi utilizzati, e a parità di metodo di calcolo utilizzato per determinarlo. Il motivo di questi valori relativamente bassi rispetto alla scala in cui abbiamo operato nel nostro esperimento è sicuramente da ritrovarsi nella condizione ambientale della Sicilia che in genere è molto meno favorevole allo sviluppo dei funghi patogeni contro cui viene abitualmente utilizzato il rame. Questi funghi infatti (peronospora) prediligono condizioni ambientali umide, mentre in Sicilia spesso prevalgono condizioni di clima più secche. Avere inserito un nespoletto biologico e un terreno incolto in prossimità della città è stato un esperimento interessante. I valori ottenuti da questi ultimi due sono infatti i due valori più elevati, che quasi sveltano rispetto ai valori ottenuti per i vigneti. La causa potrebbe essere data da un quantitativo diverso di rame utilizzato dalle due coltivazioni, dal tipo di terreno, nei due casi diverso da quello dei vigneti, ma anche dalla vicinanza della città che potrebbe portare un ulteriore contributo sotto forma di polveri ed aerosol. Tuttavia anche in questa situazione, *Trichoderma harzianum* sarebbe in grado di vivere senza risentire delle concentrazioni di rame.

Si deve inoltre tenere conto che dei valori di rame rilevati nei suoli, solo percentuali molto ridotte potrebbero essere quelle effettivamente assorbibili, si calcola 1 o 2% del totale. Il valore però potrebbe anche essere più elevato, tenendo conto che lavorazioni, contenuto di acqua, ioni circolanti in essa, attività dei microrganismi, fenomeni di risalita capillare, sono tutti fattori che possono contribuire ad aumentare queste percentuali, e quindi incrementare la quantità di rame a disposizione.

*Trichoderma harzianum* nel corso dell'esperimento ha dimostrato di essere in grado di vivere e crescere in un substrato inquinato con concentrazioni elevate di solfato di rame, a livelli elevati rispetto a concentrazioni presenti in natura. I suoli siciliani fino ad ora esaminati mostrano livelli di concentrazione del rame nettamente inferiori a quelli dell'esperimento. Per

conseguenza l'utilizzo del ceppo *Trichoderma harzianum* può permettere di ottenere buoni risultati per la protezione della pianta senza dovere ricorrere ad applicazioni di solfato di rame, di cui si ipotizza la definitiva messa al bando nell'Unione Europea a breve, visto che i quantitativi consentiti sono stati già abbassati e si ritiene che verranno ulteriormente abbassati.

La buona capacità di resistenza del fungo al rame fa intuire che le colonie non subiranno danni neanche nelle fasi iniziali di crescita e formazione che spesso sono le più critiche. Un dato interessante da rilevare è che la maggioranza dei funghi usati in esperimenti analoghi, solitamente proviene da siti inquinati e molto spesso si sceglie proprio il sito inquinato come luogo da cui ottenere il ceppo resistente. Nel nostro caso il fungo è stato scelto da un centro micologico in base alla sua dichiarata attività antagonistica, mentre non vi erano informazioni sulle sue capacità di resistenza al rame. Un ulteriore studio da portare avanti è quindi la valutazione se queste doti di resistenza sono rilevabili anche in altri ceppi di *Trichoderma harzianum*.

Un ulteriore passo da compiere sono le prove di campo. Avendo ottenuto in laboratorio in situazioni sfavorevoli un buon risultato, sarebbe utile valutare il comportamento in campo inoculando il ceppo in piante di vite, valutandone così il comportamento in una situazione decisamente più complessa.

In molti casi si usano funghi allo scopo di depurare reflui. Molto spesso sono funghi patogeni come *Aspergillus*, *Mucor* o *Penicillium* a dare i risultati migliori, ma si tratta anche di funghi spesso difficili da gestire o pericolosi. *Trichoderma harzianum* potrebbe rivelarsi efficace in questo campo e potrebbe portare alla messa a punto di una tecnica di depurazione gestibile anche in un'azienda agricola, dove la presenza di funghi patogeni potrebbe invece creare difficoltà di gestione.

## Bibliografia

- 1) Adamo P., Iavazzo P., Albanese S., Agrelli D., De Vivo B., Lima A. *“Bioavailability and soil-to-plant transfer factors as indicators of potentially toxic element contamination in agricultural soils”* 2014 Science of the Total Environment, Elsevier
- 2) Ambuse M. G., Chatage V. S. and Bhale U. N. *“Influence of Trichoderma sp. Against Alternaria tenuissima inciting leaf spot of Rumex acetosa L.”* 2012 Bioscience Discovery 3(2): 259 -262, June 2012 ISSN: 2229-3469 (Print)
- 3) Argese E., Rigo C., Gamper U., Bedini S., Simion M., Gobbo L., Sburlino G. *Studio sul bioaccumulo di metalli pesanti in specie vegetali di un sito contaminato* 2005 available online at <http://www.xvcongresso.societaitalianaecologia.org/articles/>
- 4) Giridhar Babu, Jaehong Shim a, Keuk-Soo Bang, Patrick J. Shea, Byung-Taek Oh, *“Trichoderma virens PDR-28: A heavy metal-tolerant and plant growthpromoting fungus for remediation and bioenergy crop production on mine tailing soil”* 2014 Journal of Environmental Management 132 (2014) 129e134 Elsevier
- 5) Barré P., Velde B. *“Soil, plants and clay minerals”* 2010 Springer.
- 6) Bedini S., Pellegrino E., Argese E., Giovannetti M. *“Miglioramento del suolo e biostabilizzazione di metalli pesanti mediati da glomalina”*. 2004 XIV Congresso della Società Italiana di Ecologia.
- 7) Chaparro A. P., Hoyos Carvajal L., Orduz S. *“Fungicide tolerance of Trichoderma asperelloides and T.harzianum strains”* 2011 Agricultural Science 2 (2011) 301-307 Openly accessible at <http://www.scirp.org/journal/AS/>
- 8) Guixin Chua, Steven A. Wakelinb, Leo Condrond, Alison Stewartd *“Effect of soil copper on the response of soil fungal communities to the addition of plant residues”* 2010 Pedobiologia International Journal of Soil Biology Elsevier.
- 9) Clémence M. Bes & R. Jaunatre & M. Mench *“Seed bank of Cu-contaminated topsoils at a wood preservation site: impacts of copper and compost on seed germination”* 2012 Environ Monit Assess DOI 10.1007/s10661-012-2686-x Springer.

- 10) Benedetti A., Mocali S. *“La qualità del suolo: chiave delle produzioni sostenibili”* 2009 Società Italiana della Scienza del Suolo (SISS) *Ital. J. Agron. / Riv. Agron.*, 2009, 1 Suppl.:13-21
- 11) Boix-Fayos C., Calvo-Cases A., Imeson A.C., Soriano-Soto M.D. *“Influence of soil properties on the aggregation of some Mediterranean soils and the use of aggregates size and stability as land degradation indicators”*. 2001 Catena, Elsevier
- 12) Borie F., Rubio R., Morales A. *“Arbuscular Mycorrhizal Fungi And soil Aggregation”* 2008 *R.C.Suelo Nutr. Veg.* 8 (2).
- 13) Bossuyt H., Six J., Degryze S., Denef K. *“A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics”*. 2004 *Soil and tillage research* (Elsevier).
- 14) Brice Kedi, Josiane Abadie, Joseph Sei, Hervé Quiquampoix *“Interaction of enzymes with soil colloids: adsorption and ectomycorrhizal phosphatase activity on tropical soils”*, 2010 World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. Brisbane Australia, published on DVD.
- 15) Yariv Brotman, Udi Landau, A' lvaro Cuadros-Inostroza, Tohge Takayuki, Alisdair R. Fernie ,Ilan Chet, Ada Viterbo, Lothar Willmitzer *“Trichoderma-Plant Root Colonization: Escaping EarlyPlant Defense Responses and Activation of theAntioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance”* 2013 *PLOS Pathogens* | [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org) 1 March 2013 | Volume 9 | Issue 3 | e1003221
- 16) Caruso G. *“Influenza dei metodi di produzione agricola sulla qualità dei suoli in oliveti siciliani.”* (2014)
- 17) Cenci R. M., Cocchi L., Petrini O., Sena F., Siniscalco C., Vescovi L. *“Elementi chimici nei funghi superiori.”* 2010, JRC Scientific and Technical Report.
- 18) C. P. Cornea, A. Pop, S. Matei, M. Ciuca, C. Voaides M.a Matei, G. Popa, A. Voicu, M. Stefanescu *“Antifungal action of new trichoderma spp. romanian isolates on different plant pathogens”* 2009 *BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL. EQ.* 23/2009/SE SPECIAL EDITION/ON-LINE
- 19) Cornelissen S. *“The impact of copper on filamentous fungi and Yeasts present in soil”* 2004 University of Stellenbosch.
- 20) Cosentino S. *“Phytoremediation – Sistemi di recupero di terreni degradati.”* A.A. 2011/12 Università degli Studi di Catania, Facoltà di Agraria.



- 21) Del Monte M. *“Organismi pionieri e rocce: le patine a ossalati di calcio”*  
Università di Bologna, Dipartimento di Scienze della Terra e Geologico-Ambientali Via Zamboni 67, 40127, Bologna, Italy
- 22) Deluisa A., Vicentini L., Coletti V. *“Rame nei vigneti biologici del Friuli Venezia Giulia”* 2007 Notiziario ERSA
- 23) De Stefano S., Nicoletti R. e Beato O. *“Pachibasina e crisofanolo, due antrachinoni prodotti dal fungo Trichoderma aureoviride”* 1999 *Il Tabacco*, 7(2), 1999: 21-24
- 24) Devendra Kumar Verma and Anek Pal Gupta *“Removal of heavy metals from whole sphere by plants working as bioindicators- A review”* 2013 Basic Research Journal of Pharmaceutical Science Vol. 1(1).
- 25) Di Bella V. *“Funghi del suolo e metalli pesanti: meccanismi di interazione e prospettive d’impiego”* 2012 Relatore Torta L. Università degli Studi di Palermo
- 26) E. Lopez Errasquin, C. Vazquez *“Tolerance and uptake of heavy metals by Trichoderma atroviride isolated from sludge”* 2003 *Chemosphere* 50 (2003) 137–143 Elsevier
- 27) Fengge Zhang, Zhen Zhu, Beibei Wang, Ping Wang, Guanghui Yu, Minjie Wu, Wei Chen, Wei Ran, Qirong Shen *“Optimization of Trichoderma harzianum T-E5 biomass and determining the degradation sequence of biopolymers by FTIR in solid-state fermentation”* 2013 *Industrial Crops and Products* 49 (2013) 619–627
- 28) Marina Fomina, Euan P. Burford, Steve Hillier, Martin Kierans, and Geoffrey M. Gadd *“Rock-Building Fungi”*. 2010 *Geomicrobiology Journal*, 27:624–629, 2010 Copyright © Taylor & Francis Group, LLC.
- 29) Fregoni M. Corallo G. *“Il rame nei vigneti italiani”*. 2001 Vignevisi.
- 30) Frascari D., Zanaroli G., Nocentini M., Fava F. *“Bioremediation, i ritardi dell’Italia”*. 2010 *Ecoscienza* n°3.
- 31) Fiume F. *“Condizioni Biologiche.”*
- 32) Fiume G., Napolitano S., Marziano F., Ciscognetti E., Correale F., Raimo S., Bove C., Fiume F. *“Studio del fungo antagonista Trichoderma harzianum per il contenimento di alcune malattie del pomodoro.”* 2008 *ATTI Giornate Fitopatologiche*, 2008, 2, 547-554

- 33) Geoffrey M. GADD “*Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation*” 2007 Science Direct Elsevier
- 34) M. Giovannetti, A. Turrini, P. Strani, C. Sbrana, L. Avio, B. Pietrangeli. “*Mycorrhizal fungi in ecotoxicological studies: Soil impact of fungicides, insecticides and herbicides*” 2006 Prevention Today.
- 35) Gnanassaloni V. D. V., Jebapriya G. R., Jnanadoss J. J. “*Bioremediation of hazardous pollutants using fungi*”. 2013 International journal of computing algorithm.
- 36) Ghosh M. Singh S. P. “A review on Phytoremediation of heavy metals and utilization of its Bioproducts” 2005 APPLIED ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL RESEARCH
- 37) Gochev V. K. and Krastanov A. I “*Isolation of Laccase Producing Trichoderma Spp.*” 2007 *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13 (2007), 171-176  
*National Centre for Agrarian Sciences*
- 38) Grandi S. “*Caratteristiche dei compost utilizzati nella sperimentazione e analisi dell’accumulo dei metalli pesanti nei terreni*” Agenzia Provinciale per il Compostaggio
- 39) Biljana Gveroska<sup>1</sup>, Jugoslav Ziberoski “*Trichoderma harzianum as a biocontrol agent against Alternaria alternata on tobacco*” 2012 ATI - Applied Technologies & Innovations Volume 7 | Issue 2 | June 2012 |pp.67-76
- 40) David Hagerberg & Nina Manique & Kristian K. Brandt & John Larsen & Ole Nybroe & Stefan Olsson “*Low Concentration of Copper Inhibits Colonization of Soil by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus intraradices and Changes the Microbial Community Structure*” 2011 Microb Ecol. Springer
- 41) Harman G., Howell C. R., Viterbo A., Chet I. and Lorito M. “*Trichoderma species –opportunistic, avirulent plant symbionts*” 2004 NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY
- 42) Hazrat Ali, Ezzat Khan, Muhammad Anwar Sajad “*Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications*” 2013 Chemosphere, Elsevier.
- 43) Heikinheimo L. “*Trichoderma reesei cellulases in processing of cotton*” 2002 Dissertation for the degree of Doctor of Technology
- 44) Hoorman J.J. “*The Role of Soil Fungus*” 2011, The Ohio State University

- 45) Kelly J. J. Eggholm M. M. H. Tate R. L. “*Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles*” 2003 Biol Fertil Soils, Springer
- 46) Kirka J. L., Lee A. Beaudette, Hartb M., Moutoglisc P., Klironomosb J.N., Hung Leea, Trevorsa J. T., “*Methods of studying soil microbial diversity* 2004 *Journal of Microbiological Methods*” 58 (2004) 169– 188 J.L. Kirk et al. / *Journal of Microbiological Methods* 58 (2004) 169–188 Elsevier
- 47) Klein D. A. and M.W. Paschke “*Filamentous Fungi: The Indeterminate Lifestyle and Microbial Ecology* “ 2004 Microbial Ecology
- 48) Akbar Karimi, Habib Khodaverdiloo, Mozhgan Sepehri and Mirhassan Rasouli Sadaghiani “*Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal contaminated soils*” 2011 African Journal of Microbiology Research Vol. 5(Available online <http://www.academicjournals.org/ajmr>)
- 49) László Kredics<sup>1</sup>, Zsuzsanna Antal<sup>1</sup>, László Manczinger<sup>2</sup>, András Szekeres<sup>2</sup>, Ferenc Kevei<sup>2</sup> and Erzsébet Nagy<sup>1</sup> 2003 “*Influence of Environmental Parameters on Trichoderma Strains with Biocontrol*” *Potential Food Technol. Biotechnol.* 41 (1) 37–42 (2003)
- 50) Muhammad Omer Khan and Saleem Shahzad “Screening of Trichoderma Species For Tolerance To Fungicides” 2007 *Pak. J. Bot.*, 39(3): 945-951, 2007.
- 51) Donald Y. Kobayashi and Jo Anne Crouch “*Bacterial/Fungal Interactions: From Pathogens to Mutualistic Endosymbionts*” 2009 *Annu. Rev. Phytopathol* The *Annual Review of Phytopathology* is online at [phyto.annualreviews.org](http://phyto.annualreviews.org).
- 52) Rajeev Kumar, A. K. Gupta<sup>1</sup>, R. M. Tripathi, Amit Chattree “*Monitoring Heavy Metals Contamination in Yamuna River for its toxicity level in water, sediments and fish.*” 2013 *IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology (IOSR-JESTFT)* e-ISSN: 2319-2402,p- ISSN: 2319-2399. Volume 5, Issue 5 (Sep. - Oct. 2013), PP 113-118 [www.Iosrjournals.Org](http://www.Iosrjournals.Org)
- 53) Katarina Ihrmark<sup>1</sup>, Nashwan Asmail, Wimal Ubhayasekera, Petter Melin, Jan Stenlid and Magnus Karlsson “*Comparative Molecular Evolution of Trichoderma Chitinases in Response to Mycoparasitic Interactions*” 2010 *Evolutionary Bioinformatics*
- 54) Nur Liyana Iskandar, Nur Ain Izzati Mohd Zainudin, Soon Guan Tan “*Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a*

- freshwater ecosystem*” 2011 Journal of Environmental Sciences 2011, 23(5) 824–830
- 55) W.M. Jaklitsch<sup>1</sup>, G.J. Samuels, A. Ismaiel, H. Voglmayr “*Disentangling the Trichoderma viridescens complex*” 2013 Research Article Persoonia 31, 2013: 112–146 [www.ingentaconnect.com/content/nhn/pimj](http://www.ingentaconnect.com/content/nhn/pimj)
  - 56) Lambert D. H., Baker D. E., and Cole H. Jr. “*The Role of Mycorrhizae in the Interactions of Phosphorus with Zinc, Copper, and Other Elements*” 1979 Soil Sci. Soc. Am.
  - 57) Lester D. “*Understanding and Using Trichoderma Fungi*” 2010 Maimum Yield Australia.
  - 58) Leyval K. Turnau K. Haselwandter “*Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects*” 1997 Mycorrhiza, Springer.
  - 59) Alfred Sello Likuku<sup>1</sup>, Khumoetsile B. Mmolawa, Gilbert Kabelo Gaboutloeloe “*Assessment of Heavy Metal Enrichment and Degree of Contamination Around the Copper-Nickel Mine in the Selebi Phikwe Region, Eastern Botswana*”. 2013 Environment and Ecology Research , Horizon Research Publishing
  - 60) K.A. Mackie, H.P. Schmidt, T. Müller, E. Kandeler “*Cover crops influence soil microorganisms and phytoextraction of copper from a moderately contaminated Vineyard*”. 2014 Science of the Total Environment 500–501 (2014) 34–43 Elsevier
  - 61) K.A. Mackie, T. Müller, S. Zikeli, E. Kandeler “*Long-term copper application in an organic vineyard modifies spatial distribution of soil micro-organisms*” 2013 Soil Biology & Biochemistry 65 (2013) 245e253 Elsevier.
  - 62) L. Maderova, M. Watson, G.I. Paton “*Bioavailability and toxicity of copper in soils: Integrating chemical approaches with responses of microbial biosensors*” 2011 Soil Biology & Biochemistry 43 (2011) 1162e1168 Elsevier.
  - 63) Mahmoud A. Ess and Mohamed El-Ameen A. Farragallah “*Clay minerals and their interactions with heavy metals and microbes of soils irrigated by various water resources at Assiut Egypt*” 2006 Ass. Univ. Bull. Environ. Res. Vol. 9 No. 2
  - 64) Marra R. “*Genomica funzionale e potenziali applicazioni biotecnologiche dell’interazione molecolare tra pianta, funghi patogeni e microrganismi benefici*”. 2008 Tesi di Dottorato XX Ciclo Università di Napoli Federico II

- 65) M. Mazhabi, H. Nemati, H. Rouhani, A. Tehranifar, E. M. Moghadam, H. Kaveh and A. Rezaee “*The effect of Trichoderma on Polianthes qualitative and quantitative properties*” 2011 The Journal of Animal & Plant Sciences, 21(3): 2011, Page: 617-621 ISSN: 1018-7081
- 66) Minello F. “*Fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti e metalloidi*”. 2010 Tesi di dottorato Università Ca’Foscari Venezia
- 67) Montealegre, J. et al. “*Biocontrol capacity of wild and mutant Trichoderma harzianum (Rifai) strains on Rhizoctonia solani 618: effect of temperature and soil type*” 2009 Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458
- 68) Montecchio L. “*Il ruolo delle simbiosi ectomicorriziche nel benessere delle piante forestali*” 2006 Petria Rassegna Review Università di Padova Dipartimento TESAF.
- 69) MONTECCHIO L., MOTTA E., MUTTO ACCORDI S. “*Le ectomicorrize come indicatori di salute delle piante forestali*” Dipartimento Territorio e sistemi agro-forestali, Università degli Studi di Padova Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, C.R.A., Roma
- 70) Morin M., Tan M., Gali H., Mahilac M. “*Effect of Trichoderma Sp on the reducing of pathogen agents of Esca grapevine cankers in winegrape nursery*”. ANADIAG Group
- 71) Muniappan R. “*Trichoderma in Agriculture*” 2012 USAID Virginia Tech.
- 72) Romeu-Moreno and A. Mas “*Effects of Copper Exposure in Tissue Cultured Vitis vinifera*” 1999 J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 2519-2522
- 73) Mykhailo M. Vinichuk “*Copper, zinc, and cadmium in various fractions of soil and fungi in a Swedish forest*” 2013 Taylor & Francis Informa Ltd
- 74) Naiyanan Ariyakanon and Banchagan Winaipanich “*Phytoremediation of Copper Contaminated Soil by Brassica juncea (L.) Czern and Bidens alba (L.) DC. var. radiata*” 2006 J. Sci. Res. Chula. Univ., Vol. 31, No. 1
- 75) National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio 45268 “*Introduction to Phytoremediation*” 2000 EPA USA
- 76) Neagoe A., Iordache V., Bergmann H., and Kothe E. “*Patterns of effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plants grown in contaminated soil*” 2013 J. Plant Nutr. Soil Sci.

- 77) C.J. Ofoegbu, E.I. Akubugwo, C.C. Dike, H.C.C.Maduka, C.E.Ugwu, N.A. Obasi, *"Effects of Heavy Metals on Soil Enzymatic Activities in the Ishiagu Mining Area of Ebonyi State-Nigeria"*. 2013 *IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*
- 78) Osama A. M., Xiuli H., Pin X., Shaima H., Yanbing L., Gehong W. *"Biosorption of Copper (II) from Aqueous solutions using non-living Mesorhizobium amorphae Strain CCNWGS0123"* 2012 *Microbes and Environments*.
- 79) N. Ozbay and S.E. Newman, W.M. Brown *"The Effect of the Trichoderma harzianum Strains on the Growth of Tomato Seedlings"* 2004 *Proc. XXVI IHC . Managing Soil-Borne Pathogens*
- 80) Pandya, J.R., Sabalpara, A.N. and Chawda, S.K. *"Trichoderma: a particular weapon for biological control of Phytopathogens"* 2011 *Journal of Agricultural Technology* 2011 Vol. 7(5): 1187-1191 Available online <http://www.ijat-aatsea.com> ISSN 1686-9141
- 81) Paradelo R. & Maria T. Barral *"Effect of moisture and disaggregation on the microbial activity of soil"* *Soil and tillage research* (2009) Elsevier.
- 82) Peciulite D. *"Increased Soil Heavy Metal Concentrations Affect the Structure of Soil Fungus Community"* 2011 ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER
- 83) Peciulite D *"Effect of copper sulfite on the soil fungal community structure"* 2001 *Ekologija Vilnius*
- 84) Peciulite D. *"Interrelations of soil fungi in heavy metal surroundings"* 2002 *Ekologija Vilnius*
- 85) Jovicic J. P, Danilovic G., Curcic N., Milinkovic M. Stosici M., Pankovic D. and Raicevici V. *"Copper Tolerance of Trichoderma species"* 2014 *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 66 (1), 137-142, 2014 DOI:10.2298/ABS1401137J
- 86) Persiani M., Maggi O., Montalvo J., Casado M. A. & Pineda F.D. *"Mediterranean grassland soil fungi: Patterns of biodiversity, functional redundancy and soil carbon storage"* 2008 *Plant Biosystems*, Vol. 142, No. 1,
- 87) Pertot I., Gamba U., Martin M. *"Il rame è indispensabile per l'agricoltura biologica? Usi, problemi e possibili alternative."* 2009 *Atti del workshop di agricoltura biologica Campus salone della nuova agricoltura a cura del C.R.A.B. S.c.r.l.*

- 88) Prakash, Karthik Raja Namasivayam, N. Niveditha and K. Vishnu Tejaswini  
*"Optimization of humic acid by Trichoderma viridi and it's effect on sorghum plant"* Journal of Biopesticides 3(1 Special Issue) 155 - 157 (2010)
- 89) Pravin P., Rupali D., Dibyendu S., Summer B., Mandakini P., Padmini D.  
*"Symbiotic role of Glomus mosseae in phytoextraction of lead in vetiver grass(Crysopogon zizanioides)"* 2009 Journal of Hazardous Materials Elsevier.
- 90) Purnima Anand, Jasmine Isar, Saurabh Saran, Rajendra Kumar Saxena  
*"Bioaccumulation of copper by Trichoderma viride"* 2005 Bioresource Technology 97 (2006) 1018–1025 Elsevier
- 91) Rabia Ashraf and Tasneen Adam Ali *"Effect of heavy metals on soil microbial community and mung beans seed germination"* 2007 Pak. J. Bot., 39(2): 629-636,
- 92) Rashad M. *"Bioremediation of some heavy metals in soils"*. 2007 Arid Land Cultivation and Development Research Institute.
- 93) Thilagavathi Rasu , Nakkeeran Sevugapperumal, Raguchander Thiruvengadam and Samiyappan Ramasamy *"Trichoderma asperellum, Identified as a Novel Fungal Biocontrol Agent for the Control of Plant Pathogen"* 2012 International Conference on Bioscience, Biotechnology and Healthcare Sciences (ICBBHS'2012) December 14-15, 2012 Singapore
- 94) C.R. Rini and K.K Sulochana *"Short communication Substrate evaluation for multiplication of Trichoderma spp."* 2007 Journal of Tropical Agriculture 45 (1-2): 58–60, 2007
- 95) Rodolfi M. *"Simbiosi e Associazioni simbiotiche"* Presentazione Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri Sezione di Micologia, Università degli Studi di Pavia.
- 96) Rodolfi M. *"Fungal Bioremediation"* Dipartimento di ecologia del Territorio Sezione di Micologia Università degli Studi di Pavia
- 97) Ruyters S., Salaets P., Oorts K., Smolders E. *"Copper toxicity in soils under established vineyards in Europe: A survey"*. 2013 Science of the Total Environment, Elsevier.
- 98) Sacchi E., Brenna S., Genot S. F., Sale V. M., Azzolina L., Leoni M. A. *"Analisi del contenuto in rame ed altri metalli nei suoli agricoli lombardi"* 2007 Quaderni della ricerca ERSAF.
- 99) Saia S. *"Focus Micorrize: una preziosa simbiosi"*. Dipartimento SAGA Università degli Studi di Palermo. 2011 Agrisicilia

- 100) Barbara Scherm, “*Biodiversity of the genus Trichoderma and identification of marker genes involved in the antagonism between Trichoderma spp. and plant pathogenic fungi*” Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Microbiche 2004/2007 XX Ciclo Università degli studi di Sassari.
- 101) Shafiquzzaman Siddiquee, Salleh N. Aishah, Sujjat A. Azad, Saili N. Shafawati1, Laila Naher “*Tolerance and biosorption capacity of Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup> by filamentous fungi (Trichoderma harzianum, T. aureoviride and T. virens)*” 2013 Advances in Bioscience and Biotechnology, 2013, 4, 570-583 Published Online April 2013 (<http://www.scirp.org/journal/abb/>)
- 102) Shaheen Zafar, Farrukh Aqil, Iqbal Ahmad “*Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil*” 2007 Science Direct, Elsevier.
- 103) Shoaib A., N .Aslam and N .Aslam “*Trichoderma harzianum adsorption, desorption, isotherm and FTIR studies*” 2013 The Journal of Animal & Plant Sciences.
- 104) SEYIS and N. AKSOZ: “*Production of Lactase by Trichoderma sp.*”, Food Technol. Biotechnol. 42 (2) 121–124 (2004)
- 105) Sarkar S., Naranyan P, Divakaran A., Balamurugan A., Premkumar R. “*The in vitro effect of certain fungicides, insecticides, and biopesticides on mycelial growth in the biocontrol fungus Trichoderma harzianum*” 2010 Turk J Biol34 (2010) 399-403 © TÜBİTAK doi:10.3906/biy-0812-4
- 106) Soumik Sarkar, Annamalai Satheshkumar, Robert Premkumar “*Hexavalent Chromium (Cr (VI)) Removal by Live Mycelium of a Trichoderma harzianum Strain*” 2013 Molecular Soil Biology
- 107) Sizmur T., Hodson M. E. “*The impact of Isenia veneta on As, Pb, Cu and Zn uptake by ryegrass (Lolium perenne L.)*” 2008 Mineralogical Magazine.
- 108) H. V. Sowmya & Ramalingappa & M. Krishnappa & B. Thippeswamy “*Degradation of polyethylene by Trichoderma harzianum—SEM, FTIR, and NMR analyses*” 2014 Environ Monit Assess (2014) 186:6577–6586 DOI 10.1007/s10661-014-3875-6
- 109) Subash, N1., Viji, J., Sasikumar, C and Meenakshisundaram, M “*Isolation, media optimization and formulation of Trichoderma Harzianum in agricultural soil*” 2013 J. Microbiol. Biotech. Res., 2013, 3 (1):61-64



- 110) Tapan A., Manna M. C. Singh M.V., Wanjari R. H. *“Bioremediation measure to minimize heavy metals accumulation in soil and crops irrigated with city effluents”* 2004 WFL Publisher
- 111) P.K. Tarus, C.C. Lang’at-Thoruwa, A.W. Wanyonyi and S.C. Chhabra *“Bioactive metabolites from Trichoderma harzianum and trichoderma LonBIOACTIVE METABOLITES FROM TRICHODERMA HARZIANUM AND TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM”* 2003 Bull. Chem. Soc. Ethiop. 2003, 17(2), 185-190. ISSN 1011-3924 Printed in Ethiopia
- 112) Tataranni Giuseppe, Santilli Elena, Briccoli Bati Caterina, Dichio Bartolomeo *“Influenza della simbiosi micorrizica sulla risposta vegetativa di cinque cultivar di Olea europaea L.”* Dipartimento di Scienze dei Sistemi Colturali, Forestali e dell’Ambiente, Università degli Studi della Basilicata, Viale dell’Ateneo Lucano, 10 – Potenza.
- 113) Giuseppe Tataranni, Bartolomeo Dichio and Cristos Xiloyannis *“Soil Fungi-Plant Interaction”* Advances in Selected Plant Physiology Aspects [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com) Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura-Centro di Ricerca per l’Olivicoltura e l’Industria olearia (CRA-OLI), C.da Li Rocchi, 87036 Rende – Cosenza.
- 114) Torri D., Ciampalini R., Accolti Gil P. *“The role of soil aggregates in soil erosion processes.”* CNR Soil Genesis Classification and Cartography Research Centre.
- 115) Zotti M., Di Piazza S., Roccotiello E., Lucchetti G., Mariotti M. G., Marescotti P. *“Microfungi in highly copper-contaminated soils from an abandoned Fe–Cu sulphide mine: Growth responses, tolerance and bioaccumulation”* 2014 Chemosphere Elsevier
- 116) Unknown *“Heavy Metal Soil Contamination”* 2000 USDA NRCS United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Services.
- 117) Vannette R. L. and Hunter D. M. *“Plant defence theory re-examined: nonlinear expectations based on the costs and benefits of resource mutualisms.”* 2011 Journal of Ecology
- 118) Vinalea F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L., Lorito M. *“Trichoderma–plant–pathogen interactions”* 2008 Soil Biology & Biochemistry 40 (2008) 1–10
- 119) Van der Wal A., Johannes A. van Veen J. A., Smant W., Henricus T.S. Boschker, Jaap Bloem J., Kardo P., Wim H. van der Putten and de Boer W. *“Fungal*

- biomass development in a chronosequence of land abandonment.*” 2006 Soil Biology & Biochemistry 38
- 120) Wei Shang Tan, Adeline Su Yien Ting “*Efficacy and reusability of alginate-immobilized live and heat-inactivated Trichoderma asperellum cells for Cu (II) removal from aqueous solution*” 2012 Bioresource Technology 123 (2012) 290–295 W.S. Tan, A.S.Y. Ting / Bioresource Technology 123 (2012) 290–295 Elsevier
- Yap C. K. Yazdani M. Abdullah & Tan S. G. “*Is the High Cu Tolerance of Trichoderma atroviride Isolated from the Cu-Polluted Sediment Due to Adaptation? An In Vitro Toxicological Study*” 2011 Sains Malaysiana 40(2)(2011): 119–124
- 121) Zehra Tavsan & Hulya Ayar Kayali “*The Effect of Iron and Copper as an Essential Nutrient on Mitochondrial Electron Transport System and Lipid Peroxidation in Trichoderma harzianum*” 2013 Appl Biochem Biotechnol (2013) 170:1665–1675 DOI 10.1007/s12010-013-0273-4
- 122) Zdenka Babikova, Lucy Gilbert, Toby J. A. Bruce, Michael Birkett, John C. Caulfield, Christine Woodcock, John A. Pickett and David Johnson “*Underground signals carried through common mycelia networks warn neighbouring plants of aphid attack*” 2013 Ecology Letters
- 123) Zotti M., Di Piazza S., Roccatiello E., Lucchetti G., Mariotti G. M., Marescotti P. “*Microfungi in highly copper-contaminated soils from an abandoned Fe–Cu sulphide mine: Growth responses, tolerance and bioaccumulation*” 2014 Chemosphere 117 (2014) 471–476